

**Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ**  
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ**  
**ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

**ΖΕΡΝΟΥ ΔΙΟΝΥΣΙΑ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2005**

**Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ – ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ**  
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ**  
**ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

**ΖΕΡΝΟΥ ΔΙΟΝΥΣΙΑ**  
**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ Γ.**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2005**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η βοήθεια των συνεργατών μου ήταν πολύτιμη και ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την προϊστάμενη του τμήματος της Α' Χημικής Υπηρεσίας Πειραιά την κ.Μαστραντώνη Ιωάννα η οποία με περιέβαλε με ιδιαίτερη αγάπη.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κ.Καραβόλτσο Σ., και τον κ.Χατζηαντωνίου Δ., χημικούς του τμήματος, για την ιδιαίτερη προσοχή που μου έδειξαν και για το συμπληρωματικό υλικό που μου έδωσαν για την υλοποίηση αυτής της εργασίας .

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω τον εισηγητή της εργασίας μου κ.Ζακυνθινό Γ. για το άψογο πνεύμα συνεργασίας και την συμπαράσταση του, η βοήθεια του ήταν πολύ σημαντική.

Τέλος ,θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα του γονείς μου για τα εφόδια που έχουν δώσει μέχρι σήμερα , και το φίλο κ. Αρχιμανδρίτη Γ. , διότι έδειξε ιδιαίτερη ανοχή και κατανόηση.

Για μένα το ταξίδι της αναζήτησης τώρα αρχίζει... Τους διαβεβαιώ λοιπόν, ότι το σκαρί μου είναι γερό, μπορεί να συναντήσω πολλές φουρτούνες στο ταξίδι της καριέρας αλλά θα φθάσω σίγουρα στον προορισμό μου....

## ΕΠΙΧΟΜΕΝΑ

ΣΑΓΩΓΗ.....	1
-------------	---

## ΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	2
------------------	---

1. Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες.....	3
---------------------------------------	---

1.1.1. Αλκαλοειδή εργοτισμού.....	4
-----------------------------------	---

1.1.2. Τροφική τοξική αλλεργία.....	5
-------------------------------------	---

1.1.3. Τοξίνες κίτρινου ρυζιού.....	5
-------------------------------------	---

1.1.4. Ωχρατοξίνες.....	5
-------------------------	---

1.1.5. Πατουλίνη.....	6
-----------------------	---

2. Αφλατοξίνες.....	6
---------------------	---

2.1.1. Σημαντικοί τύποι αφλατοξινών και μεταβολιτών.....	7
--	---

3. Προέλευση αφλατοξινών – ανακαλύφθηκαν.....	7
---	---

3.1.1. Οι συντακτικοί τύποι των αφλατοξινών.....	9
--	---

3.1.2. Που τις εντοπίζουμε.....	10
---------------------------------	----

4. Παράγοντες που ευνοούν την παραγωγή αφλατοξινών.....	10
---	----

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

2. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	12
---	----

2.1. Επιπτώσεις σε ζώα – Αφλατοξίνωση και υγεία των ζώων.....	12
---	----

2.2. Επιπτώσεις στον άνθρωπο.....	13
-----------------------------------	----

2.3. Αφλατοξίνωση.....	13
------------------------	----

2.3.1. Οξεία τοξικότητα.....	14
------------------------------	----

2.3.2. Χρόνια τοξικότητα.....	14
-------------------------------	----

## ΕΦΑΛΛΙΟ 3ο

### ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> G<sub>2</sub> ΣΕ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΑ

1. Σκοπός του ελέγχου.....	15
3.1.1. Χρωματογραφία .....	15
3.1.2. Ορισμός Χρωματογραφίας .....	15
2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	16
3. Ορισμοί – Σύμβολα- Συντμήσεις.....	18
4. Αρχή της μεθόδου.....	18
5. Αντιδραστήρια.....	19
6. Συσκευές.....	20

## ΕΦΑΛΛΙΟ 4ο

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

.....	22
1. Δειγματοληψία .....	22
2. Άλεση και ομογενοποίηση δειγμάτων.....	23
4.2.1. Άλεση - ομογενοποίηση δημητριακών και καρυκευμάτων.....	23
4.2.2. Άλεση - ομογενοποίηση δειγμάτων με βρώσιμο ή μη βρώσιμο τμήμα.....	24
4.2.3. Άλεση - ομογενοποίηση δειγμάτων με μικρό βάρος.....	24
4.2.4. Άλεση - ομογενοποίηση δειγμάτων σε μορφή πολτού.....	24
4.2.5. Ζύγιση ποσοτήτων δείγματος και νερού.....	24
Υποδειγματοληψία.....	25

## ΕΦΑΛΛΙΟ 5ο

### ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Εκχύλιση.....	26
1.1. Εκχύλιση αφλατοξινών.....	26
1.2. Καθαρισμός του εκχυλίσματος μέσω ανοσοχημικής στήλης.....	27
1.3. Ανοσοχημική στήλη –Τεχνική ELISA .....	29

2. Ανάλυση με HPLC/PCD/FD.....	30
5.2.1. Ενδεικτικές παράμετροι λειτουργίας του συστήματος.....	30
5.2.2. Δημιουργία παραγώγων των αφλατοξινών.....	31
5.2.3. Φθορισμομετρικός ανιχνευτής.....	31
5.2.4. Αυτόματος δειγματολήπτης.....	31
3. Ποσοτικοί υπολογισμοί.....	31
5.3.1. Ταυτοποίηση των αφλατοξινών.....	31
5.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξινών.....	32
5.3.3. Υπολογισμός του συνόλου των αφλατοξινών.....	33

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

5.ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΑ ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ.....	33
6.1. Γράφημα I.....	34
6.2. Αναλυτικά στοιχεία ανά κατηγορία αναλύσεων και ποσοστά.....	35
6.3. Ποσοστά ακατάλληλων τελωνειακών δειγμάτων ανά χώρα και είδος.....	36
6.4. Ποσοστά ακατάλληλων αγορανομικών δειγμάτων ανά προϊόν.....	37
6.4.1. Τελωνειακά δείγματα εξαμήνου.....	38
6.4.2. Αγορανομικά δείγματα εξαμήνου.....	38
6.5. Τεκμηρίωση της μεθόδου.....	39

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

### ΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΕΣ

Δείγμα Τελωνειακό, Καρύδι αρ.δείγματος Γ.Χ.Κ 020/020/165/2005.....	40
Δείγμα Αγορανομικό, Ρύζι αρ. δείγματος Γ.Χ.Κ 020/020/326/2005/C.....	44
Δείγμα Τελωνειακό, Καλαμπόκι αρ.δείγματος Γ.Χ.Κ 020/020/322/2005.....	48
Δείγμα Εσωτερικού ελέγχου ποιότητας, Αραβόσιτος αρ.δείγματος Γ.Χ.Κ 020/020/226/15/C.....	49
Δείγμα Τελωνειακό, Κελυφωτά φυστίκια αρ.δείγματος Γ.Χ.Κ 020/020/288/2005... ..	52
Δείγμα Τελωνειακό, Αραχίδα αρ.δείγματος Γ.Χ.Κ 020/020/181/2005/C.....	57
Παρατηρήσεις –σχόλια σχετικά με τη μέθοδο.....	61
1.1. Πρότυπα διαλύματα.....	61
Συμπεράσματα - Επιλογή συνθηκών κατεργασίας δειγμάτων.....	62

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 64

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**

**ΦΥΛΛΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ, ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ.**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**

**ΦΥΛΛΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ, ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑΣ/ΗΡΛC/ΡCΔ/FD.**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ**

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΟΔΗΓΙΑΣ 98/53 Ε.Ε.**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV**

**ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΣΧΕΤΙΚΗ ΜΕ ΤΙΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ**

**Οδηγία 98/53/ΕΚ της Επιτροπής γ ια την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων για ορισμένες προσμίξεις στα τρόφιμα**

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V**

**ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΠΙΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΑΡΠΩΝ.**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο Γ.Χ.Κ. στο διαπιστευμένο εργαστήριο (από Ε.Σ.Υ.Δ, σύμφωνα με το πρότυπο (ΕΛΟΤ EN ISO 17025) της Α' Χημικής Υπηρεσίας Πειραιά, εργάστηκα πάνω στον προσδιορισμό των καρκινογόνων ουσιών (αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) επιβλαβών για την δημόσια υγεία. Οι αφλατοξίνες είναι μια κατηγορία μυκοτοξινών οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων και είναι δυνατόν να είναι παρούσες σε μεγάλο αριθμό τροφίμων.

Γι' αυτό το λόγο η Ελληνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία έχει θεσπίσει όρια για πολλές κατηγορίες προϊόντων.

Στην παρούσα εργασία, θα τονιστεί το εύρος των δυσμενών επιπτώσεων που έχουν οι μυκοτοξίνες στη δημόσια υγεία και ιδιαιτέρως των αφλατοξινών.

Επίσης, θα γίνει περιγραφή της τεχνικής της μεθόδου προσδιορισμού αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> σε γεωργικά προϊόντα και κυρίως σε ξηρούς καρπούς, ξηρά φρούτα, δημητριακά και αρτύματα για την διαπίστωση συμμόρφωσης προς τις διατάξεις των Κανονισμών της Ελληνικής και Ευρωπαϊκής νομοθεσίας. Επιπλέον θα γίνει μια αναφορά, των αναλύσεων που διεξήχθησαν βάσει πραγματικών στοιχείων.

Η εργασία αυτή συνδυάζει τόσο βιβλιογραφικά δεδομένα και περιγραφή μεθοδολογίας όσο αναλύσεις για τον προσδιορισμό αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> σε γεωργικά προϊόντα, που χειρίστηκε το Γ.Χ.Κ από 01/04/05 – 01/10/05.

## RESUME

During my probationary period at the General Chemical Laboratory of State at the accredited laboratory from E.S.Y.D, according to the model (of the Greek Organism of foods, EN ISO 17025) of A' Chemical Service of Piraeus, I worked mainly on the determination of carcinogenic substances (aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) which are harmful to public health. The aflatoxins are a class of mycotoxins which are produced by certain kinds of fungi and may be found in a wide range of foods.

For this reason the Greek and European legislation has defined the limits of many classes of products.



Also, will become description of her technical method of determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in agricultural products and mainly in dry fruits, land fruits, cereals and seasoning in order to as certain whether they conform to the provisions and regulations of the Greek and European legislation. In addition, will become a report, the analyses that were carried out based on real elements.

This study, combines as bibliographic data and description of methodology as analyses for the determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in agricultural products, that it handled General Chemical Laboratory of State from 01/04/05 – 01/10/05.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία συνεχή διατροφικά σκάνδαλα και οι κατασχέσεις τεραστίων ποσοτήτων τροφίμων που περιείχαν επικίνδυνες για την υγεία μας ουσίες, θορύβησαν τους Ευρωπαίους καταναλωτές και οδήγησαν σε κρίση αξιοπιστίας όλο το διατροφικό κλάδο με αποτέλεσμα να ενισχυθεί το ενδιαφέρον και η ευαισθητοποίηση του καταναλωτικού κοινού σε θέματα ποιότητας, ασφάλειας και υγιεινής τροφίμων.

Πρόσφατα παραδείγματα οι μεγάλες ποσότητες φυστικών Αιγίνης που εντόπισε και δέσμευσε η Νομαρχία Πειραιά γιατί διαπιστώθηκε ότι είχαν συγκεντρώσει υψηλές ποσότητες αφλατοξινών, ουσίες επικίνδυνες όταν ευνοηθεί η ανάπτυξη τους πέρα από τα επιτρεπτά όρια (Ημερήσιος Τύπος).

Στη χώρα μας οι προϋποθέσεις για την παραγωγή (εξασφάλιση) υγιεινών τροφίμων είναι ευνοϊκές με δεδομένη τη μεγάλη ζήτηση εγχώριων προϊόντων, τόσο στην εσωτερική όσο και στη διεθνή αγορά επιβάλλεται να γίνουν συντονισμένες προσπάθειες από την πολιτεία και τους άλλους συνεργαζόμενους φορείς προς την κατεύθυνση ενός συστηματικού έλεγχου τροφίμων.

Η αναγνώριση, τόσο σε κοινωνικό, όσο και σε πολιτικό επίπεδο των επιπτώσεων των τοξινών και η ανάγκη της διασφάλισης της δημόσιας υγείας έχουν δημιουργήσει ένα ιδιαίτερα αυστηρό κλίμα όσον αναφορά στην ασφάλεια και τον ποιοτικό έλεγχο.

Η στροφή των καταναλωτών σε ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα είναι πλέον εμφανής και αναμένεται να ενταθεί τα επόμενα χρόνια.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

### 1.ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικές χημικές ουσίες που παράγονται από συγκεκριμένους τοξιγενείς νηματοειδής μύκητες και μπαίνουν στην τροφική αλυσίδα ανθρώπων και ζώων είτε με τους μύκητες που τις παράγουν, είτε ως τοξίνη που παραμένει και μετά την καταστροφή του μύκητα. Είναι τοξικοί μεταβολίτες, έχουν μικρό μοριακό βάρος, είναι ανθεκτικές στις μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων και βρίσκονται σε προϊόντα ζωικής και φυτικής προελεύσεως.

Η δράση των μυκοτοξινών είναι αθροιστική, δηλαδή συσσωρεύονται κατά την κατανάλωση επιμολυσμένων τροφίμων και δημιουργούν βλάβη στον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, πολλές μυκοτοξίνες είναι θερμοανθεκτικές και γι'αυτό δεν καταστρέφονται κατά το μαγείρεμα των τροφίμων στα οποία περιέχονται.

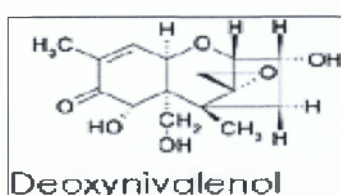
Οι μυκοτοξίνες απαντώνται σε τρόφιμα με χαμηλό pH και χαμηλό ποσοστό υγρασίας, όπως καλαμπόκι, προϊόντα καλαμποκιού, σιτάρι (γενικά δημητριακά και τα άλευρα τους) και ξηρούς καρπούς. Επίσης, σιτηρέσια αγροτικών ζώων που περιέχουν καρπούς διατηρημένους σε ακατάλληλες συνθήκες αποτελούν πιθανή πηγή αφλατοξινών (συγκεκριμένα της M<sub>1</sub>), οι οποίες αποθηκεύονται στον οργανισμό γαλακτοπαραγωγών ζώων (π.χ. αγελάδες, πρόβατα κ.α.) και ακολούθως στο εκκρινόμενο από αυτά γάλα. Επιπλέον, η προσβολή του ξενιστή (π.χ. φυσικιά) από έντομα, η χαμηλή γονιμότητα εδαφών, η υψηλή πυκνότητα σοδειάς και η παρουσία άλλων ειδών μυκήτων ή μικροβίων, μπορούν να οδηγήσουν σε μη αποδεκτά επίπεδα μυκοτοξινών.

Ο τύπος και το ποσοστό των τοξινών που θα παραχθούν, εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις σε μύκητες, ξενιστή και περιβάλλον. Ο κατάλληλος συνδυασμός αυτών των παραγόντων καθορίζει την προσβολή του υποστρώματος και τη δημιουργία αποικιών.

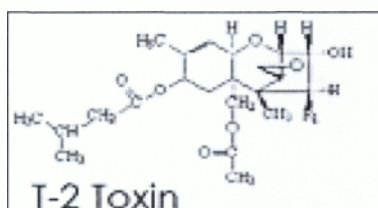
Οι κλιματολογικές συνθήκες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και κυρίως κατά την ανθοφορία, επηρεάζουν σημαντικά την περιεκτικότητα σε μυκοτοξίνες. Παρόλο ότι οι παράγοντες που συντελούν στη δημιουργία τοξινών δεν είναι εντελώς γνωστοί, εντούτοις ορθές πρακτικές κατά την καλλιέργεια, συγκομιδή και αποθήκευση, μειώνουν τους συντελεστές επικινδυνότητας και συμβάλουν κατά το δυνατό στην πρόληψη της επιμόλυνσης. (Αρβανιτογιάννης και Τζούρος 2004).

### 1.1. Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες είναι:

- Οι Τριχοθισίνες (δεσοξυνιβαλενόνη (DON), νιβαλενόλη, τοξίνη T-2 και η τοξίνη HT-2), οι Φουμονισίνες και η Ζεαραλενόνη που προέρχονται από το μύκητα *Fusarium*.
- Οι Αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> οι οποίες παράγονται από είδη του μύκητα *Aspergillus*.
- Η Ωχρατοξίνη A και η Πατουλίνη που προέρχονται από το μύκητα *Penicillium*.  
(Drorackova Ivana 1990)



Εικ.1. Συντακτικός τύπος της δεσοξυνιβαλενόνης (DON)



Εικ.2. Συντακτικός τύπος της τοξίνης T-2

Οι μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες και τα τρόφιμα στα οποία συνήθως αναπτύσσονται οι μύκητες αναφέρονται στον Πίνακα Α.

ΠΙΝΑΚΑΣ Α : Μερικές αντιπροσωπευτικές μυκοτοξίνες στα τρόφιμα:

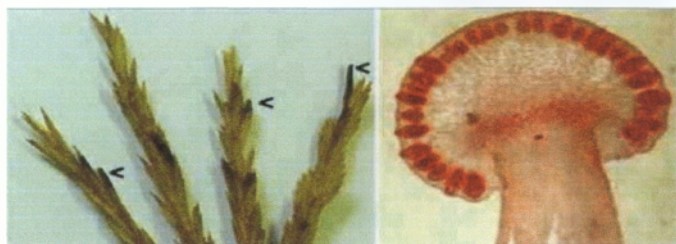
Μυκοτοξίνες	Αντιπροσωπευτικοί μύκητες	Ευαίσθητα τρόφιμα	Αποτελέσματα
Αφλατοξίνες B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Ξηροί καρποί, ξηρά φρούτα, δημητριακά και μπαχαρικά	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
Αφλατοξίνες M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub>		Γαλακτομικά	
Αλκαλοειδή εργοτισμού	<i>Claviceps purpurea</i>	Δημητριακά, χλόες	Νεφροπάθειες

Ωχρατοξίνες	<i>Penicillium viridicatum</i>	Δημητριακά, καφές, σοκολάτα, σταφίδες, τσάι, κρασί, προϊόντα ζωικής προέλευσης	Βλάβες στα νεφρά
Ωχρατοξίνη Α	<i>Aspergillus ochraceus</i>	προϊόντα ζωικής προέλευσης	
Πατουλίνη	<i>Penicillium expansum</i>	Μήλα	Τροφογενείς λοιμώξεις
Φουμορισίνες	<i>Fusarium moniliforme</i>	Αραβόσιτος	Καρκίνος στον οισοφάγο
Τοξίνες κίτρινου ρυζιού	<i>Penicillium slandicum.</i>	Κίτρινο ρύζι	Παράλυση κεντρικού νευρικού συστήματος, βλάβες σε ήπαρ και νεφρά.

### 1.1.1. Αλκαλοειδή εργοτισμού

Ο εργοτισμός είναι η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση μυκοτοξίνωσης μια ασθένεια που οφείλεται στην κατανάλωση κριθαριού μολυσμένου από τον μύκητα *Claviceps purpurea*.

Ο μυκηλιακός του ιστός παράγει έναν αριθμό αλκαλοειδών, που είναι παράγωγα του λυσεργικού οξέος. Ο εργοτισμός είναι δύο τύπων: γαγγραινώδης και σπασμωδικός. Ο δεύτερος τύπος, ο συνηθέστερος, παρουσιάζει τα εξής συμπτώματα: εμετό, διάρροια, δυσκολία στην ομιλία, σπασμούς, παραισθήσεις, λιποθυμία και σε σοβαρές περιπτώσεις καταλήγει στο θάνατο. (Autrup H. and Seremet T.1990)



**Εικ.3.** Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε το μολυσμένο κριθάρι (αριστερά) από το μύκητα *Claviceps purpurea* (δεξιά).

### 1.1.2 .Τροφική τοξική αλευκία:

Είχε παρουσιασθεί στην Ε.Σ.Σ.Δ. κατά το διάστημα 1942-1947. Υπεύθυνος μύκητας είναι ο *Fusarium sporotrichioides*, όταν αναπτύσσεται σε αποθηκευμένους σπόρους (σιτάρι, κεχρί και κριθάρι) διατηρημένους υπό ακατάλληλες συνθήκες. Η ανάπτυξη του μύκητα είναι δυνατή ακόμη και στους  $-10^{\circ}\text{C}$ , ενώ το μέγιστο της παραγωγής της τοξίνης του παρουσιάζεται περί του  $0^{\circ}\text{C}$ . Η τοξίνη (σποροφουσαρίνη) δεν καταστρέφεται ακόμη και με θέρμανση στους  $125^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά.(Bennett and Klich 2003)

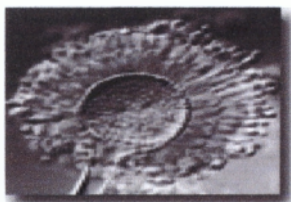
Τα αρχικά συμπτώματα είναι εμετός και διάρροια, αλλά μετά από μία περίοδο ενός μήνα έως ενός έτους δίχως συμπτώματα, η κατάσταση του ασθενούς επιδεινώνεται δραματικά. Τα τελικά συμπτώματα περιλαμβάνουν εξανθήματα, πληγές στο στόμα και το λάρυγγα και λευχαιμία. Η θνησιμότητα των προσβληθέντων υπερβαίνει το 50%.

### 1.1.3. Τοξίνες κίτρινου ρυζιού

Στελέχη του γένους *Penicillium* παράγουν πλήθος μυκοτοξινών σε τρόφιμα ιδιαίτερα στο ρύζι, χρωματίζοντας το κίτρινο σε θερμό και υγρό περιβάλλον. Το είδος *Penicillium islandicum* παράγει μυκοτοξίνες που καταστρέφουν το ήπαρ, του *P.citrinum* τα νεφρά και του *P.citreoviride* προκαλούν παράλυση του κεντρικού νευρικού συστήματος.(Bennett and Klich 2003)

### 1.1.4. Ωχρατοξίνες

Οι μύκητες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium viridicatum* παράγουν τις ωχρατοξίνες. Απαντώνται σε μουχλιασμένους σπόρους, κυρίως κριθάρι και ξηρούς καρπούς. Η πιο τοξική από τις ωχρατοξίνες, η ωχρατοξίνη A(L phenylalanine N- (5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H<sub>2</sub>-benzopyran-7-yl)carbonyl-(R) isocoumarin) προκαλεί νεφροπάθειες. Βρίσκεται στα δημητριακά και τα προϊόντα αυτών, στις σταφίδες, στον καφέ, στην σοκολάτα, το τσάι, το κρασί και σε προϊόντα ζωικής προελεύσεως.( Bennett and Klich 2003)



**Εικ.4.** Ο μύκητας *Aspergillus ochraceus*, ο οποίος παράγει την ωχρατοξίνη A

#### 1.1.5. Πατουλίνη ( 4-hydroxy-4H-furo(3,2-c)pyran-2(6H)-one)

Η πατουλίνη παράγεται από ορισμένα είδη μυκήτων *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssoschylamys* τα οποία κυρίως αναπτύσσονται σε φρούτα, σιτηρά και τυρί. Η πατουλίνη δρα ως αντιβιοτικό ,είναι νευροτοξική , γονοτοξική, και προκαλεί τροφογενείς λοιμώξεις. Η πατουλίνη ελέγχεται στα πλαίσια της εφαρμογής του Κανονισμού 466/2001(L77/16-3-2001), όπως έχει τροποποιηθεί με τον Κανονισμό 1425/2003/EK, (L203/12-8-2003). Η δειγματοληψία γίνεται σύμφωνα με τους όρους της Οδηγίας 2003/78/EK( L203/12-8-2003), με ιδιαίτερη προσοχή διότι τα δείγματα είναι ευαλοίωτα.(Αρβανιτογιάννης και Τζούρος 2004).

#### 1.2 Αφλατοξίνες ( B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> & M<sub>2</sub>)

Οι Αφλατοξίνες (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> & M<sub>2</sub>) είναι μυκοτοξίνες (τοξικοί μεταβολίτες), οι οποίες παράγονται από είδη του μύκητα *Aspergillus* από τον *Aspergillus flavus* και τον *Aspergillus parasiticus*.

Η παρουσία τους σε γεωργικά προϊόντα είναι αναπόφευκτη. Οι μύκητες αυτοί αναπτύσσονται κυρίως σε υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος σε συνδυασμό με υψηλή υγρασία. Η περιεκτικότητά τους ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική θέση, τον τρόπο καλλιέργειας, τις πρακτικές που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της συγκομιδής, της αποθήκευσης και της επεξεργασίας, καθώς επίσης και από την επιδεκτικότητα του προϊόντος στην εισβολή των μυκήτων.

Παρόλο ότι η δράση τους είναι απρόβλεπτη, ήδη από το 1960 είναι γνωστές ως μεταλλαξιογόνες, γονοτοξικές καρκινογόνες ουσίες.

Οι αφλατοξίνες έχουν συνδεθεί με διάφορες αρρώστιες, όπως είναι η αφλατοξίνωση τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Τα περισσότερα γεωργικά προϊόντα (ξηροί καρποί, ξηρά φρούτα και δημητριακά) περιέχουν ομάδες αφλατοξινών (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), των οποίων η τοξικότητα και η περιεκτικότητα ποικίλλουν. Η αφλατοξίνη B<sub>1</sub> είναι η πλέον τοξική.( Ross and Yuan 1992). Η Ευρωπαϊκή Ένωση, με στόχο την προστασία της δημόσιας υγείας , έχει θεσπίσει όρια μέγιστων τιμών ως προς την περιεκτικότητα της B<sub>1</sub> καθώς και της συνολικής περιεκτικότητας των αφλατοξινών (Κανονισμός 1525/98 EK, όριο 4μg/Kg για το σύνολο των αφλατοξινών και 2μg./Kg για την B<sub>1</sub>).





**Εικ.5.** Ο μύκητας *Aspergillus flavus*, ο οποίος παράγει την αφλατοξίνη B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub>

### 1.2.1. Σημαντικοί τύποι αφλατοξινών και μεταβολιτών

Τουλάχιστον 13 διαφορετικοί τύποι αφλατοξινών παράγονται στη φύση. Η αφλατοξίνη B<sub>1</sub> θεωρείται η τοξικότερη και παράγεται από τον *Aspergillus flavus* και τον *Aspergillus parasiticus*. Η αφλατοξίνη G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> παράγεται αποκλειστικά από τον *A. parasiticus*. Η παρουσία του *Aspergillus* στα τρόφιμα δεν δηλώνει πάντα τα επιβλαβή επίπεδα αφλατοξίνης αλλά μπορεί να υπονοεί ένα σημαντικό κίνδυνο στην κατανάλωση του προϊόντος. ( Groopman and Scholl 1996).

- Αφλατοξίνη B<sub>1</sub> & B<sub>2</sub>: παράγεται από τον *Aspergillus flavus* και τον *Aspergillus parasiticus*.
- Αφλατοξίνη G<sub>1</sub> & G<sub>2</sub>: παράγεται από τον *Aspergillus parasiticus*.
- Αφλατοξίνη M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub>: προϊόντα μεταβολισμού της αφλατοξίνης B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub>

### 1.3. Προέλευση Αφλατοξινών - Πως ανακαλύφθηκαν

Στη δεκαετία του '60 περισσότερες από 100.000 γαλοπούλες σε κτηνοτροφικές μονάδες της Αγγλίας πέθαναν μέσα σε διάστημα λίγων μηνών από μια νέα αρρώστια η οποία σύντομα εξαπλώθηκε σε παπάκια και φασιανούς με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας.

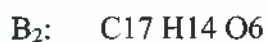
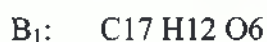
Μια προσεκτική έρευνα στα πρώτα ξεσπάσματα έδειξε ότι ήταν όλα συσχετισμένα με την τροφή Βραζιλιάνικο φυστίκι, το οποίο μετά από εντατική έρευνα αποδείχτηκε ιδιαίτερα τοξικό για τα πουλερικά και τα παπάκια. Ο τοξικός μύκητας αναγνωρίστηκε ως ο *Aspergillus flavus* και η τοξίνη που παράγει ονομάστηκε αφλατοξίνη λόγω της καταγωγής της (*A.flavus*). ( Ankrah and Abrahams 1993).

Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε σε μια ολοένα αυξανόμενη ανησυχία για τον κίνδυνο που προέρχεται από την ύπαρξη αφλατοξινών στα τρόφιμα. Στη συνέχεια παρατηρήθηκαν ασθένειες που προκαλούν ακόμα και το θάνατο στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά. Μελέτες αποκάλυψαν ότι οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> προκαλούνται κυρίως από τον μύκητα *A. flavus* και *A. parasiticus*, σπανιότερα από τον *A. nomius* και *A. niger*.

Αποδείχτηκε επίσης ότι, η M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub> αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού της B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub> τα οποία αρχικά απομονώθηκαν στο γάλα (Heathcote and Hibbert 1978).

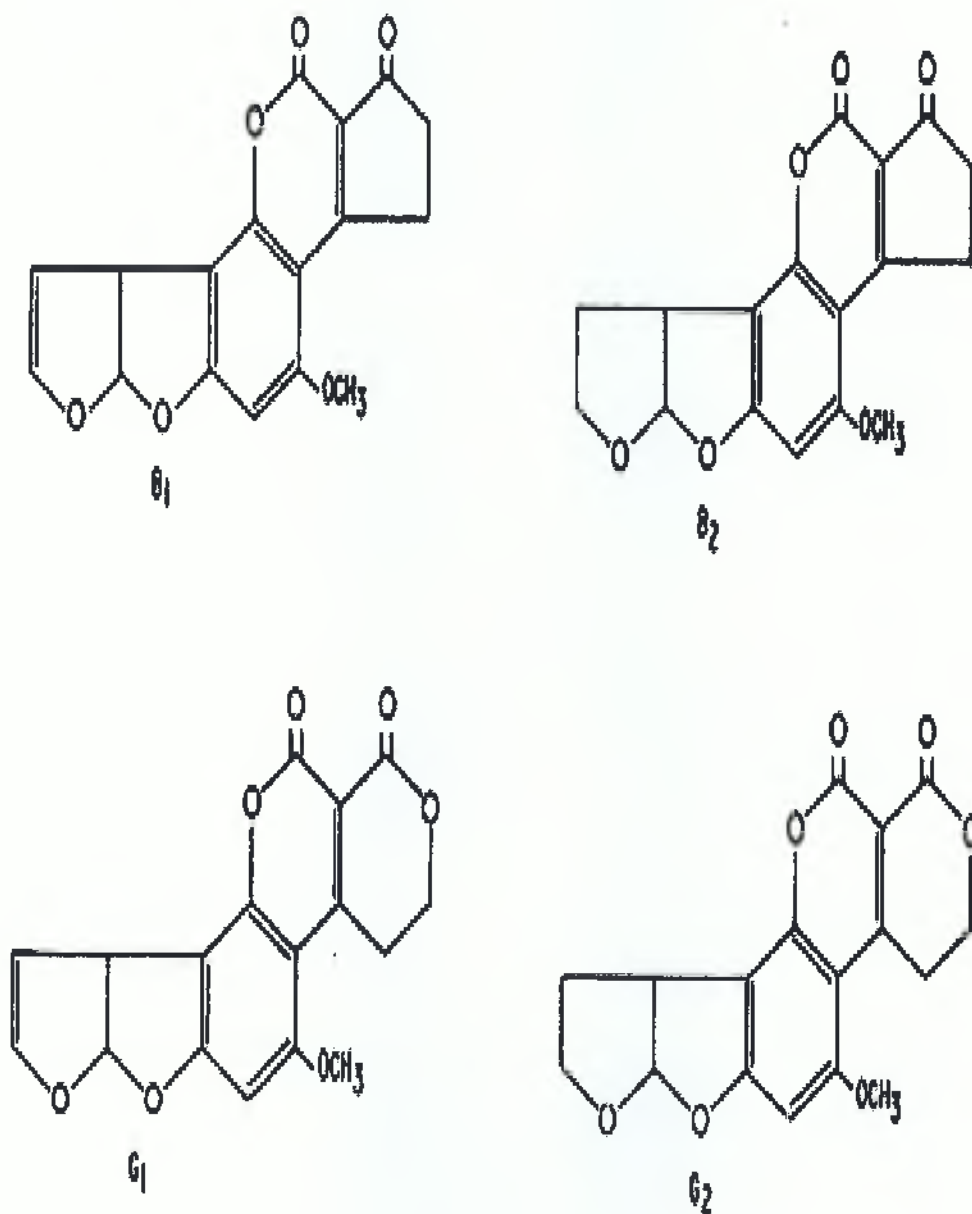
Η Αφλατοξίνη M<sub>1</sub> θεωρείται λιγότερο γονοτοξική από την B<sub>1</sub>. Η M<sub>1</sub> βρίσκεται στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προέρχονται από ζώα τα οποία έφαγαν μολυσμένα με B<sub>1</sub> τρόφιμα. Προσδιορίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, με φθορισμομετρικό ανιχνευτή, μετά από κατάλληλη εκχύλιση ανάλογα με το υπόστρωμα (γάλα-γιαούρτι) και καθαρισμό από στήλη η οποία περιέχει μονοκλωνικά αντισώματα, ώστε να διαχωριστεί από ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάλυση.

Οι παραπάνω τοξίνες έχουν παρόμοιες δομές και σχηματίζουν μοναδικό σύνολο φυσικών ετεροκυκλικών συμπλόκων. Ο μοριακός τους τύπος όπως καθιερώθηκε από στοιχειώδης αναλύσεις έχει ως εξής:



Οι αφλατοξίνες B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub> προέκυψαν από τα διυδροξίνα παράγωγα των B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> αντίστοιχα. Ενώ οι αφλατοξίνες M<sub>1</sub> είναι 4-διυδροξίνη, παράγωγο της αφλατοξίνης B<sub>1</sub> και η M<sub>2</sub> είναι 4-διυδροξίνη, παράγωγο της αφλατοξίνης B<sub>2</sub>. (Hendry and Cole 1993).

### 1.3.1.Οι συντακτικοί τύποι των αφλατοξινών



**Εικ.6.** Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε τους συντακτικούς τύπους της B<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) της B<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>), της G<sub>1</sub>(C<sub>17</sub> H<sub>12</sub> O<sub>7</sub>) και της G<sub>2</sub> (C<sub>17</sub> H<sub>14</sub> O<sub>7</sub>). (Dutton and Lean 1995).

### 1.3.2. Που τις εντοπίζουμε.

#### ❖ Σε ακατέργαστα γεωργικά προϊόντα

Οι αφλατοξίνες συνήθως απαντώνται σε γεωργικά προϊόντα στο στάδιο πριν τη συγκομιδή. Αφλατοξίνες μετά τη συγκομιδή μπορεί να εντοπιστούν εφόσον καθυστερήσει η ξήρανση των προϊόντων και όταν αποθηκεύονται σε αποθηκευτικούς χώρους με υγρασία ή χώρους που ευνοούν την δημιουργία μούχλας. Οι αφλατοξίνες M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub> εντοπίζονται περιστασιακά στο γάλα και στο τυρί. Οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> βρίσκονται στο καλαμπόκι, στις αραχίδες, σε βαμβακόσπορους, σε καρύδια, αμύγδαλα, σύκα, καρυκεία και σε μια ποικιλία από άλλες τροφές. Το γάλα, τα αβγά και τα προϊόντα κρέατος περιέχουν μυκοτοξίνες λόγω της μολυσμένης με αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub> τροφής που καταναλώνουν τα ζώα από τα οποία προέρχονται. Παρόλα αυτά, τα εμπορεύματα με τη μεγαλύτερη επικινδυνότητα είναι το καλαμπόκι, τα φυστίκια και οι βαμβακόσποροι.(Miller and Thenholm 1994).

#### ❖ Σε κατεργασμένες τροφές

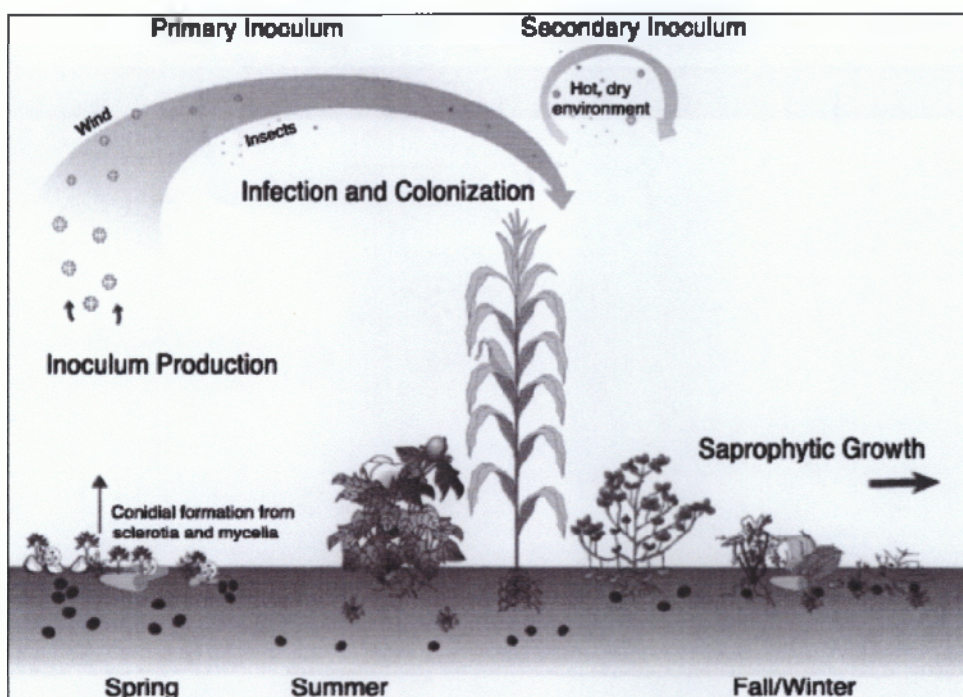
Το καλαμπόκι αποτελεί τη βασική τροφή για πολλές χώρες και ως εκ τούτου προκαλεί τη μεγαλύτερη ανησυχία παγκοσμίως, καθώς μεγαλώνει σε κλίματα υγρά που ευνοούν τη δημιουργία αφλατοξινών. Παρόλα αυτά, οι μέθοδοι επεξεργασίας που εφαρμόζονται για την κατεργασία του καλαμποκιού βοηθούν στη μείωση της μόλυνσης στο τελικό προϊόν. Αυτό συμβαίνει διότι οι αφλατοξίνες είναι ασταθείς σε αλκαλικές ή οξειδωτικές συνθήκες. Η χρήση προϊόντων από καλαμπόκι και βαμβακόσπορους που περιέχουν αφλατοξίνες, ως ζωοτροφές προκαλεί την δημιουργία της M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub> στο γάλα και στα προϊόντα αυτών. (Miller and Thenholm 1994).

## 1.4 Παράγοντες που ευνοούν την παραγωγή αφλατοξινών

Η ανάπτυξη μυκήτων και η δημιουργία αφλατοξινών είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους μύκητες, τον ξενιστή και το περιβάλλον. Ο κατάλληλος συνδυασμός αυτών των παραγόντων καθορίζει την προσβολή και τη δημιουργία αποικιών του υποστρώματος, καθώς και τον τύπο και το ποσοστό της αφλατοξίνης που θα παραχθεί. Παρόλα αυτά απαιτείται ικανό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μυκήτων και την παραγωγή τοξινών, αν και οι παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό των τοξινών δεν είναι απόλυτα

καθορισμένοι. Το νερό, η υψηλή θερμοκρασία και η καταστροφή του ξενιστή από έντομα είναι οι βασικοί παράγοντες για την παραγωγή μούχλας και τοξινών.

Ομοίως, συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης των φυτών, χαμηλή γονιμότητα, υψηλή πυκνότητα σοδειάς, και ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα αγριόχορτα έχουν συνδυαστεί με την αύξηση της μούχλας και την παραγωγή τοξινών. Ο σχηματισμός των αφλατοξινών επηρεάζεται ακόμα και από τη συνδυαζόμενη εξέλιξη άλλων ειδών μούχλας ή μικροβίων. Για παράδειγμα, η μόλυνση από αφλατοξίνες σε φυστικά και καλαμπόκι της προσυγκομιδής ευνοείται από υψηλές θερμοκρασίες, παρατεταμένες συνθήκες ξηρασίας και έντονη δραστηριότητα εντόμων, ενώ στη μετασυγκομιδή ευνοείται από λιγότερο ήπιες θερμοκρασίες και πολύ υγρασία. ( Miller and Thenholm 1994)



**Εικ.7.** Στην παραπάνω εικόνα βλέπουμε τρία φυτά στο στάδιο της προσυγκομιδής. (βαμβάκι, καλαμπόκι, φυστικά). Κατά την ανάπτυξη του *Aspergillus flavus* στο έδαφος παράγονται κονίδια (παραγωγή μολύσματος, χρονική περίοδος Άνοιξη) από τα μυκήλια (mycelia) και τα σκληρότια (sclerotia) του μύκητα. Τα κονίδια (αρχικό μόλυσμα) μεταφέρονται με τη βοήθεια των εντόμων και του αέρα και μολύνουν κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού τα πλέον ανεπτυγμένα φυτά όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ευνοϊκές, όπως αυξημένη θερμοκρασία και έντονη ξηρασία.(δευτερογενής μόλυσμα). Κατά το Φθινόπωρο, κατά την πτώση των φύλλων, τα κονίδια συνεχίζουν να διαβιούν ως σαπρόφυτα στα υπολείμματα των φυτών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

### 2.ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

#### 2.1. Επιπτώσεις σε ζώα- Αφλατοξίνωση και υγεία των ζώων.

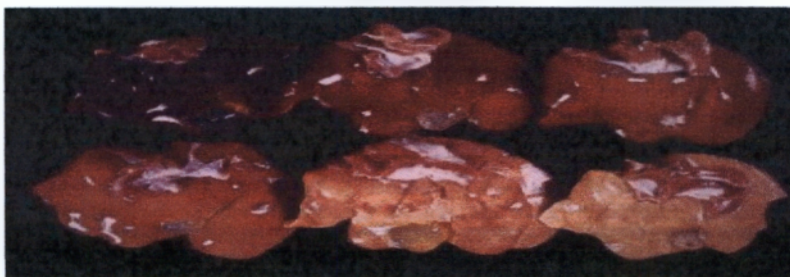
Τα συνήθη επίπεδα μυκοτοξινών στις ζωοτροφές δεν προκαλούν ορατά τοξικά συμπτώματα προκαλούν όμως μακροχρόνια πρωτογενή μυκοτοξίνωση και ανοσοκαταστολή σπανίως με λήψη επιμολυσμένης τροφής σε πολύ υψηλά επίπεδα, επέρχεται ο θάνατος. Οι αφλατοξίνες έχουν συνδεθεί με διάφορες αρρώστιες όπως είναι η αφλατοξίνωση τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο.

Η αφλατοξίνωση είναι αρχικά μια ηπατική ασθένεια. Η επιδεκτικότητα των ζώων στις αφλατοξίνες ποικίλει ανάλογα με το είδος, το φύλο, την ηλικία και τη διατροφή. Είναι γεγονός ότι οι αφλατοξίνες προκαλούν ζημιές στο συκώτι, μειώνουν την παραγωγή των αβγών και του γάλακτος, διακόπτουν την κύηση ως αποτέλεσμα της καταστολής του ανοσοποιητικού.Κλινικά σημάδια αφλατοξίνωσης σε ζώα περιλαμβάνουν γαστρεντερικές δυσλειτουργίες, μειωμένη αναπαραγωγή, μειωμένη ικανότητα χρησιμοποίησης της τροφής, αναιμία και ίκτερο.

Η πρόκληση καρκίνου από τις αφλατοξίνες έχει μελετηθεί εκτενώς. Οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> έχει φανεί ότι προκαλούν διάφορα είδη καρκίνου σε διαφορετικά είδη ζώων(Ross and Yuan 1992).

**Εικ.8.** Κάτωθι είναι έξι ιστοί ήπατος αρουραίων που έχουν εγχυθεί με τις αυξανόμενες δόσεις της αφλατοξίνης B<sub>1</sub>. Το ήπαρ στην επάνω αριστερή γωνία δεν έλαβε καμία αφλατοξίνη, ενώ αυτό στην κάτω δεξιά έλαβε την υψηλότερη δόση.

Παρατηρήστε την αλλαγή στο χρώμα αυτών των ιστών.



## 2.2. Επιπτώσεις στον άνθρωπο.

Η έκθεση του ανθρώπου στις αφλατοξίνες γίνεται μέσω της κατανάλωσης τροφών μολυσμένων με προϊόντα μυκητιακής αύξησης. Μια τέτοια έκθεση είναι δύσκολο να αποφευχθεί καθώς δεν είναι εύκολο να αποτρέψουμε την αύξηση των μυκήτων. Ακόμα και αν οι αυξημένες σε αφλατοξίνες προμήθειες δεν επιτρέπονται στην αγορά, παραμένει μια ανησυχία για τα πιθανά ανεπιθύμητα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μακροχρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα αφλατοξινών. Αποδείξεις για ισχυρές αφλατοξινώσεις σε ανθρώπους έχουν αναφερθεί σε διάφορα μέρη του κόσμου, στις επονομαζόμενες Τριτοκοσμικές χώρες, όπως η Ουγκάντα, η Ινδία, και πολλές άλλες. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από εμετούς, γαστρικούς πόνους, πνευμονικό οίδημα, σπασμούς, κώμα, και θάνατο από εγκεφαλικό οίδημα.( Wilmarth and Kurt 1996)

Οι συνθήκες που αυξάνουν την πιθανότητα οξείας αφλατοξίνωσης στον άνθρωπο περιλαμβάνουν περιορισμένη διαθεσιμότητα σε φαγητό, περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν την αύξηση μυκήτων στις σοδειές και τα εμπορεύματα, και η έλλειψη νομοθετικού συστήματος για τον έλεγχο των αφλατοξινών.

Επιπλέον η έκφραση των σχετικών με αφλατοξίνες ασθενειών στον άνθρωπο μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες όπως είναι η ηλικία, το φύλο, τα διατροφικά επίπεδα, και / ή η παράλληλη έκθεση σε άλλα αίτια όπως η ηπατίτιδα από ιό (HBV) ή η μόλυνση από παράσιτα.

## 2.3. Αφλατοξίνωση

Οι επιδημιολογικές κλινικές και πειραματικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι η έκθεση σε μεγάλες δόσεις (>6000mg) της αφλατοξίνης μπορούν να προκαλέσουν την οξεία τοξικότητα με θανατηφόρα επίδραση ενώ η έκθεση στις μικρές δόσεις για τις παρατεταμένες περιόδους είναι καρκινογόνος.(Groopmann και λοιποί 1988).Τα δυσμενή αποτελέσματα των αφλατοξινών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: την Οξεία τοξικότητα και την Χρόνια τοξικότητα.( Richard and Thurston 1975).

### 2.3.1. Οξεία τοξικότητα

Η οξεία τοξικότητα προκαλείται όταν λαμβάνονται οι αφλατοξίνες σε μεγάλες δόσεις. Το κύριο όργανο που βλάπτουν είναι το ήπαρ. Οι μεταβολίτες της αφλατοξίνης αντιδρούν αρνητικά με τις διάφορες πρωτεΐνες των κυττάρων, έτσι κατά αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και των λιπιδίων και η πρωτεϊνική σύνθεση υπολειπургεί, καθώς υπάρχει μια ουσιαστική μείωση των σημαντικότερων πρωτεϊνών που συντίθεται απ' το ήπαρ. .( Richard and Thurston 1975).

### 2.3.2. Χρόνια τοξικότητα

Η χρόνια, έκθεση δεν οδηγεί σε τόσο δραματικά συμπτώματα όσο η οξεία αφλατοξίνωση. Τα παιδιά, εντούτοις, επηρεάζονται ιδιαίτερα από την έκθεση τους στην αφλατοξίνη η οποία καθυστερεί την σωματική τους ανάπτυξη. Η μακροπρόθεσμη έκθεση σε χαμηλά επίπεδα αφλατοξινών έχει ως αποτέλεσμα την κίρρωση συκωτιού, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.(Ross and Yuan 1992)

Η ευαισθησία στη χρόνια και οξεία τοξικότητα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το επίπεδο της έκθεσης την διάρκεια της έκθεσης και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (εκτός από την ηλικία ,την υγεία και την θρεπτική αξία της διατροφής ).



**Εικ.9.** Ηπατικό καρκίνωμα αρχικό σε ένα 67-χρονο άτομο



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

### 3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> ΚΑΙ G<sub>2</sub> ΣΕ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΠΟΙΗΜΕΝΑ

#### 3.1. Σκοπός του ελέγχου

Σκοπός του ελέγχου είναι η διαπίστωση συμμόρφωσης προς τις διατάξεις των Κανονισμών 466/2001 και 257/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής καθώς και ο έλεγχος της επισήμανσης τυποποιημένων προϊόντων σύμφωνα με τα αντίστοιχα άρθρα του Κώδικα Τροφίμων.

##### 3.1.1. Χρωματογραφία

Για τον προσδιορισμό των παραπάνω αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα έλαβα μέρος σε αναλύσεις που έγιναν με υγρή χρωματογραφία (HPLC), φθορισμομετρικό ανιχνευτή και σύστημα παραγωγνοποίησης μετά την στήλη.

##### 3.1.2. Ορισμός Χρωματογραφίας

Για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε ο όρος αυτός, όταν για πρώτη φορά έγινε διαχωρισμός μίγματος χρωστικών ουσιών σε στήλη με προσροφητικό υλικό. Έκτοτε με τον όρο χρωματογραφία εννοούμε μια τεχνική διαχωρισμού ενός μίγματος ουσιών, κατά την οποία οι ουσίες του μίγματος διανέμονται ανάμεσα σε μια στατική και κινητή φάση. Ανάλογα με τις ιδιότητες των ουσιών του μίγματος, την συγγένειά τους προς τις δύο φάσεις (στατική και κινητή) και το είδος των δύο αυτών φάσεων, έχουμε σαν αποτέλεσμα τη διαφορετική ταχύτητα ανάπτυξης των επιμέρους ουσιών και τον τελικό διαχωρισμό τους.

Η στατική φάση είναι είτε στερεό πορώδες υλικό επιφανειακά ενεργό σε μορφή μικρών σωματιδίων είτε σε στήλη. Η κινητή φάση είναι αέριο ή υγρό.

Αν χρησιμοποιείται αέριο τότε η διαδικασία λέγεται αέρια χρωματογραφία. Η κινητή φάση είναι πάντα υγρή σε όλους τους τύπους υγρής χρωματογραφίας.

### 3.2. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

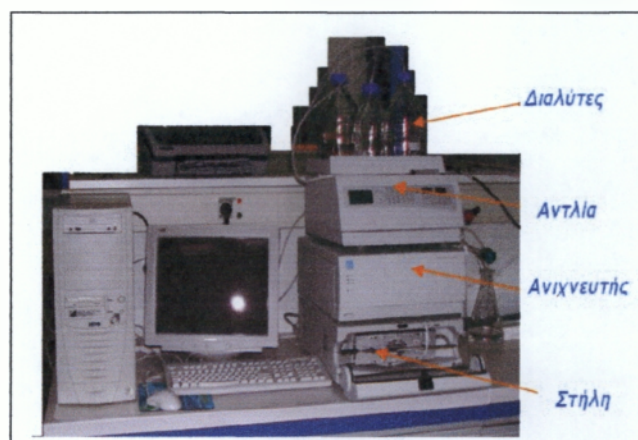
Η HPLC χρησιμοποιείται για την επίτευξη διαχωρισμού ουσιών με σταθερά διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης και σήμα ανάλογο της περιεκτικότητας τους. Οι σχεδιαστές της Martin και Synge το 1941, είχαν την ανησυχία ότι η στατική φάση απαιτεί πολύ μικρά σωματίδια άρα και χρειάζεται υψηλή πίεση για την μετακίνηση της κινητής φάσης μέσα από τη στήλη. Για αυτό το λόγο και επωνομάζεται σε υψηλής πίεσης υγρή χρωματογραφία.

Στην αντίστροφη φάσης χρωματογραφία εφαρμόζονται και είναι γνωστά τα ακόλουθα:

- Η στατική φάση είναι αρκετά μη πολική, λιποφιλική
- Η κινητή φάση είναι συγγενώς πολική

Ένας πολικός διαλύτης όπως το νερό εκλύεται πιο αργά απ' ό τι ένας λιγότερο πολικός διαλύτης όπως το ακετονιτρίλιο.

Τα βασικά λειτουργικά μέρη της HPLC είναι η αντλία, ο ανιχνευτής, η στήλη, ο θερμοστάτης στηλών, το σύστημα παραγωγιστοποίησης, το σύστημα διαλυτών έκλουσης και καθαρισμού, το καταγραφικό και προαιρετικά ο αυτόματος δειγματολήπτης.



**Εικ.10.** Τα βασικά λειτουργικά μέρη της HPLC

Η έκλυση γίνεται είτε:

ισοκρατικά όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε

κλιμακωτά όπου το μέτωπο της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό.

Με την ισοκρατική έκλουση, όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλούνται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη κλιμακωτή έκλουση γίνεται ανάμειξη ενός ασθενούς διαλύτη με έναν ισχυρό σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

Για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών χρησιμοποιείται σύστημα παραγωντοποίησης μετά την στήλη και φθορισμομετρικός ανιχνευτής.

Οι περισσότερες από τις στήλες για την HPLC είναι φτιαγμένες από 316-βαθμούς ανοξείδωτο ατσάλι, το οποίο είναι ανθεκτικό στην πίεση της HPLC και αδρανές στην διάβρωση. Το εσωτερικό της στήλης δεν πρέπει να έχει αδρές επιφάνειες ή δομές με μικροπόρους, έτσι ώστε οι ατσάλινοι σωλήνες να γυαλίζονται μετά από κοινές κατασκευές.

Ως υλικά πλήρωσης για τις στήλες της HPLC χρησιμοποιούμε συνήθως ορυκτό διοξείδιο του πυριτίου το οποίο έχει εκπληκτικές ιδιότητες και σε χημικά τροποποιημένη μορφή, ενώ λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμε αλουμίνα, άλας μαγνησίου, γυαλί με ελεγχόμενους πόρους και πορώδη γραφίτικο άνθρακα 18 ο οποίος χρησιμοποιείται και στην HPLC για τον διαχωρισμό των αφλατοξινών.

Η αντλία είναι απαραίτητη για την διοχέτευση της κινητής φάσης στην στήλη υπό υψηλή πίεση και με ελεγχόμενη ροή. Αντλία με ελεγχόμενη ροή χρησιμοποιείται επίσης στο σύστημα παραγωντοποίησης.

Περιοδικά, ανάλογα με την χρήση και την μορφή των χρωματογραφημάτων των προτύπων διαλυμάτων, η στήλη της HPLC πρέπει να καθαρίζεται για την μεγαλύτερη ακρίβεια των μετρήσεων ως ακολούθως.

Αναγέννηση της στήλης.

1. Έκπλυση με νερό για την απομάκρυνση αλάτων.
2. Έκπλυση με μεθανόλη για την απομάκρυνση υδρόφιλων ρυπαντών.
3. Έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο για την απομάκρυνση υδρόφοβων ρυπαντών.
4. Έκπλυση με διχλωρομεθάνιο για την απομάκρυνση ισχυρά υδρόφοβων ρυπαντών.
5. Έκπλυση με τετραϋδροφουράνιο, ακολούθως με μεθανόλη και στην συνέχεια με νερό, για να επανέλθει η στήλη στην αρχική της κατάσταση.

### 3.3. Ορισμοί – Σύμβολα – Συντμήσεις

g ή gr: γραμμάριο.

Kg: χιλιόγραμμα ( $=10^3$  gr).

μg: μικρογραμμάριο ( $=10^{-6}$  gr).

ng: νανογραμμάριο ( $=10^{-9}$  gr).

lit: λίτρο.

ml: χιλιοστόλιτρο ( $=10^{-3}$  lit).

μl : μικρόλιτρο ( $=10^{-6}$  lit= $10^{-3}$  ml).

min: λεπτό της ώρας.

sec: δευτερόλεπτα της ώρας.

$^{\circ}$ C : βαθμός Κελσίου.

%w/w: περιεκτικότητα εκφρασμένη σε gr περιεχόμενης ουσίας ανά 100 gr μείγματος.

% w/v: συγκέντρωση διαλύματος εκφρασμένη σε gr διαλυμένης ουσίας ανά 100ml διαλύματος.

% v/v: συγκέντρωση διαλύματος εκφρασμένη σε ml διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύματος.

SOP: τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας ( standard operating procedure).

E.E ή EE: Ευρωπαϊκή Ένωση.

Λοιποί ορισμοί ,σύμβολα ή συντμήσεις, που υπάρχουν στο παρόν κείμενο, ερμηνεύονται στα σημεία που εμφανίζονται.

### 3.4. Αρχή της μεθόδου

Δείγματα ξηρών καρπών, μπαχαρικών, ξηρών φρούτων, δημητριακών και προϊόντα αυτών, για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>, αλέθονται και ομογενοποιούνται με νερό. Από τον πολτό που προκύπτει εκχυλίζονται οι αφλατοξίνες με μεθανόλη. Ακολούθως οι αφλατοξίνες δεσμεύονται στο πληρωτικό υλικό ανοσοχημικής στήλης (IAC (immunoaffinity column )) και εν συνεχεία ανακτώνται από τη στήλη, σε κατά το δυνατόν απηλλαγμένη προσμίξεων κατάσταση, εκλούμενες με μεθανόλη.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αφλατοξινών γίνεται με σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC (high performance liquid chromatography)), το οποίο είναι εφοδιασμένο με σύστημα παραγωγοποίησης μετά τη στήλη που επιτρέπει αντίδραση με

ιώδιο προς σχηματισμό φθορίζοντος παραγώγου (PCD (post column derivatization)), το οποίο μετράται σε φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FD (fluorescence detector)).

Για την διατύπωση της γνωμάτευσης αξιολογείται η συμμόρφωση του δείγματος προς τις διατάξεις της νομοθεσίας.

### 3.5. Αντιδραστήρια

- Μεθανόλη HPLC ( $\text{CH}_3\text{OH}$  ή  $\text{MeOH}$ ).
- Μεθανόλη PA ( $\text{CH}_3\text{OH}$  ή  $\text{MeOH}$ ).
- Τετραϋδροφουράνιο HPLC ( $(\text{CH}_2)_4\text{O}$  ή THF).
- Νερό από το δίκτυο ύδρευσης ποσίμου νερού του κτιρίου του εργαστηρίου.
- Απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται ανά 2 ή 3 ημέρες από τη συσκευή 20 ΣΑΥ 01. Ισοδύναμης καθαρότητας νερό λαμβάνεται και από τη συσκευή 20 ΣΑΥ 02.
- Ιώδιο στερεό PA ( $\text{I}_2$ ).
- Κορεσμένο υδατικό διάλυμα ιωδίου.

Σε σκοτεινόχρωμη υάλινη φιάλη του 1 λίτ εισάγεται ποσότητα (περίπου 10 gr) στερεού ιωδίου και προστίθεται απεσταγμένο νερό. Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα επί εξάωρο. Η φιάλη φυλάσσεται στον χώρο του εργαστηρίου.

Πριν από κάθε χρησιμοποίηση του, το διάλυμα του ιωδίου διηθείται.

- Χλωριούχο νάτριο PA ( $\text{NaCl}$ )
- Τολουόλιο PA ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$  ή PhH)
- Ακετονιτρίλιο PA ( $\text{CH}_3\text{CN}$  ή  $\text{MeCN}$ ).
- Ανοσοχημικές στήλες (IAC) με ικανότητα συγκράτησης (capacity) τουλάχιστον 1500ng αφλατοξινών ( $\text{B}_1 + \text{B}_2 + \text{G}_1 + \text{G}_2$ ) (π.χ. ανοσοχημικές στήλες Aflaprep® του οίκου Rhodia).
- Διάλυμα  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1+1): Παρασκευάζεται με ανάμειξη ίσων όγκων  $\text{MeOH}$  HPLC και απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και δεν φυλάσσεται περαιτέρω μετά τη χρήση του.
- Αφλατοξίνες  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{G}_1$  και  $\text{G}_2$ : πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα.

Είναι δυνατή η χρησιμοποίηση όλων των προσφερόμενων στο εμπόριο προτύπων αφλατοξινών όπως: στερεές αφλατοξίνες με πιστοποιημένη υψηλή καθαρότητα (> 98% w/w), μεθαλονικά διαλύματα αφλατοξινών με πιστοποιημένη συγκέντρωση, διαλύματα αφλατοξινών σε βενζόλιο (ή τολουόλιο)/ακετονιτρίλιο με πιστοποιημένη συγκέντρωση.

- Διαγαστικό μέσο Carrez I:

Υδατικό διάλυμα τριενύδρου σιδηροκυανιούχου καλίου συγκέντρωσης 10.6( ±0.1)% w/v. Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται , υπό όχι ιδιαίτερες συνθήκες, μέχρι εξαντλήσεως του.

➤ Διαγνωστικό μέσο Carrez II :

Υδατικό διάλυμα διενύδρου οξεικού ψευδαργύρου και παγόμορφου οξεικού οξέως συγκέντρωσης 22.0 ( ± 0.1) % w/v και 3( ±0.1) % v/v αντίστοιχα. Το διάλυμα αυτό φυλάσσεται , υπό όχι ιδιαίτερα συνθήκες , μέχρι εξαντλήσεως του.

➤ Χλωρίνη οικιακού τύπου του εμπορίου (υδατικό διάλυμα NaClO, περιεκτικότητας 4.8%w/v περίπου σε ενεργό χλώριο) .

➤ Υγρό απορρυπαντικό καθαρισμού πιάτων του εμπορίου , οικιακού τύπου .

➤ Βαμβάκι φαρμακευτικής χρήσης , του εμπορίου .

➤ Μεθανολικό διάλυμα 12.5% :

Παρασκευάζεται με ανάμειξη 50 ml M<sub>e</sub>OH p.a και 350 ml απεσταγμένου νερού και φυλάσσεται υπό όχι ιδιαίτερα συνθήκες μέχρι εξαντλήσεως του.

### 3.6. Συσκευές

- Μύλος άλεσης δημητριακών και μπαχαρικών.
- Ηλεκτρικό blender οικιακού τύπου.
- Ηλεκτρική μηχανή κοπής κρέατος οικιακού τύπου.
- Ομογενοποιητής μεγάλων ποσοτήτων (-25Kg) τύπου SILVERSON-B% με υδραυλικό σύστημα ανάρτησης.
- Ομογενοποιητής μικρών ποσοτήτων (της τάξεως των 10<sup>2</sup> gr), υψηλών ταχυτήτων, τύπου Ultra-Turrax T25.
- Ζυγός με ικανότητα ζύγισης τουλάχιστον 15Kg και με ανάγνωση έως και πρώτου δεκαδικού ψηφίου.
- Ζυγός με ικανότητα ζύγισης τουλάχιστον 2,5Kg και με ανάγνωση έως και δεύτερου δεκαδικού ψηφίου.
- Υάλινος θάλαμος κενού για εκχυλίσεις διαμέσου στερεών φάσεων (solid phase extraction : SPE) δώδεκα θέσεων.
- Σύστημα χρωματογραφικής ανάλυσης (HPLC/PCD/FD), αποτελούμενο από:
  - Ισοκρατική αντλία HPLC.
  - Χειροκίνητη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος τύπου Rheodyne με βρόχο εισαγωγής

συγκεκριμένου όγκου δείγματος.

- Αυτόματο δειγματολήπτη

- Σύστημα δημιουργίας παραγώγων μετά από τη στήλη HPLC αποτελούμενο από δοσιμετρική αντλία αντιδραστηρίου παραγωντοποίησης και θερμοστατούμενο αντιδραστήρα.

➤ Φθορισμομετρικό ανιχνευτή.

Ηλεκτρονικό υπολογιστή για την λήψη και επεξεργασία του σήματος του ανιχνευτή και εκτυπωτή για την εκτύπωση των χρωματογραφημάτων.

➤ Μαγνητικός αναδευτήρας.

➤ Ηλεκτρικός αναδευτήρας δοκιμαστικών σωλήνων.

➤ Αυτόματες μηχανικές πιπέτες.

▪ Μεταβλητού όγκου , επιλεγόμενου στην περιοχή 20-200 μl ανά 0.2 μl

▪ Μεταβλητού όγκου , επιλεγόμενου στην περιοχή 100- 1000 μl ανά 1μl

▪ και πλαστικά ακροφύσια (tips) μιας χρήσεως ,κατάλληλα για τις αντίστοιχες αυτόματες μηχανικές πιπέτες

➤ Ψηφιακή υάλινη μηχανική σύριγγα 500μl

➤ Ψυγείο οικιακού τύπου (2-8°C)

➤ Καταψύκτης οικιακού τύπου (-20°C)

➤ Πλαστικές σύριγγες μίας χρήσεως των 5 ml , των 20 ml και των 50ml

➤ Υάλινες κωνικές φιάλες των 100 ml εσφυρισμένες

➤ Υάλινες κωνικές φιάλες των 250 ml απλές και εσφυρισμένες

➤ Υάλινα χωνιά

➤ Υάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι των 250 ml, των 100 ml, και των 50 ml.

➤ Υάλινοι ή πλαστικοί δοκιμαστικοί αριθμημένοι σωλήνες με πόμα όγκου τουλάχιστον 4 ml

➤ Υάλινα σιφώνια δύο χαραγών , κατηγορίας A , όγκων 10 ml, 5 ml, 2 ml και 1 ml και αριθμημένα κατηγορίας A, όγκων έως 10ml και έως 5 ml

➤ Υάλινες ογκομετρικές φιάλες κατηγορίας A , όγκων 10 ml, 5 ml, 2 ml, 25 ml ή 50 ml

➤ Χάρτινοι ηθμοί κατασκευασμένοι από σύνηθες διηθητικό χαρτί

Προτιμώνται "σκληροί" πτυχωτοί ηθμοί.

➤ Ελαστικά γάντια (latex) μιας χρήσεως .

➤ Χρονόμετρο .

➤ Υάλινα δοχεία (βάζα) με βιδωτό πόμα , ευρύλαιμα, για την φύλαξη των πολτοποιημένων δειγμάτων.

- Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός : διηθητικό χαρτί και κοινό χαρτί του εμπορίου.
- Αλουμινόχαρτο, παραφίλμ , πλαστικές και υάλινες πιπέτες rauster μιας χρήσεως.
- Ποτήρια ζέσεως (υάλινα ή πλαστικά) διαφόρων μεγεθών.
- Πουάρ υάλινων σιφονίων , μικροασκοί αναρρόφησης υάλινων πιπετών.
- Πλαστικές λεκάνες και πλαστικοί κουβάδες με χειρολαβές .
- Σπαθίδες . κοχλιάρια , μαχαίρια , κουτάλες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

### 4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ – ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Οι δειγματοληψίες συνιστάται να γίνονται σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες εθνικές και ευρωπαϊκές κοινοτικές διατάξεις (π.χ. Οδηγίες 1998/53 και 2002/27 Ε.Β.) .

Δείγματα με πολύ μικρό βάρος (< 50 gr) δεν γίνονται αποδεκτά εκ μέρους του Εργαστηρίου προς ανάλυση αφλατοξινών .

#### 4.1.Δειγματοληψία

Επειδή η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην αξιοπιστία του προσδιορισμού της περιεκτικότητας των αφλατοξινών, οι οποίες εμφανίζονται με ιδιαίτερα ετερογενή τρόπο στις παρτίδες, συνιστάται αυτή να γίνεται σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες εθνικές και ευρωπαϊκές κοινοτικές διατάξεις, (όπως οι Οδηγίες 1998/53 και 2002/27 Ε.Ε. και τα αντίστοιχα άρθρα του Κώδικα Τροφίμων.

Η δειγματίζουσα αρχή οφείλει να ακολουθήσει τις διατάξεις και τις επεξηγηματικές διατάξεις της Οδηγίας 1998/53/ΕΕ (Παράρτημα IV) και να στείλει ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα, σφραγισμένο, στην ετικέττα του οποίου πρέπει να αναγράφεται το είδος του δείγματος, η χώρα προέλευσης, η παρτίδα, η ημερομηνία δειγματοληψίας, ο φορέας που έκανε την δειγματοληψία καθώς επίσης να υπογράφεται από τον αρμόδιο για την δειγματοληψία.

Τα παραπάνω στοιχεία πρέπει να αναγράφονται και στο πρωτόκολλο δειγματοληψίας, (Παράρτημα III) το οποίο επιπλέον πρέπει να αναφέρει την συνολική ποσότητα του εμπορεύματος της ίδιας παρτίδας, τον κάτοχο του εμπορεύματος, την χώρα προέλευσης καθώς και το συγκεκριμένο ερώτημα προς το εργαστήριο (π.χ. Προδιορισμός της περιεκτικότητας των αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>.)



Το δείγμα πρέπει να αποστέλλεται στο ΓΧΚ εντός τριών ημερών. Εάν τα δείγματα έχουν ληφθεί σύμφωνα με την Οδηγία 1998/53 /ΕΕ(Παράρτημα IV), κατά την διαδικασία της άλεσης, ομογενοποίησης και υποδειγματοληψίας, συντάσσεται πρωτόκολλο το οποίο επισυνάπτεται με τα υπόλοιπα συνοδευτικά έγγραφα του δείγματος.

## 4.2. Άλεση και ομογενοποίηση δειγμάτων

Κατά την προετοιμασία του δείγματος επιδιώκεται η παρασκευή ενός κατά το δυνατόν ομογενούς πολτού (με την ελάττωση μεγέθους του δείγματος και διασπορά του σε νερό), ώστε να εξασφαλίζεται η αντιπροσωπευτικότητα της υποδειγματοληψίας.

Όταν το εξεταζόμενο προϊόν αποτελείται από βρώσιμο και από μη βρώσιμο τμήμα, προσδιορίζεται κατ' αρχήν η αναλογία βάρους του βρώσιμου μέρους επί του συνολικού βάρους του προϊόντος . Ο προσδιορισμός αυτής της αναλογίας βαρών γίνεται σύμφωνα με την Οδηγία 1998/53 Ε.Ε. (Παράρτημα IV) ως εξής : ζυγίζονται συνολικά περίπου 100 ακέραιοι καρποί, ληφθέντες ισάριθμοι από όλα τα πιθανά επιμέρους δείγματα του συνολικού δείγματος εν συνεχεία αποχωρίζονται και ζυγίζονται τα βρώσιμα τμήματα τους και υπολογίζεται το ζητούμενο ποσοστό :  $\beta = 100 \chi$  (βάρους βρώσιμου τμήματος των καρπών) / (ολικό βάρος των καρπών)

Ανάλογα με το εξεταζόμενο δείγμα (είδος δείγματος, προσκομιζόμενη ποσότητα) επιλέγεται μία από τις παρακάτω διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος .

### 4.2.1. Άλεση -Ομογενοποίηση δημητριακών και καρυκευμάτων

Προϊόντα όπως είναι τα δημητριακά (σιτάρι, αραβόσιτος) και τα καρυκεύματα (σε μη τριμμένη μορφή), τα οποία έχουν μεγάλη σκληρότητα, αρχικά και ανεξάρτητα από την ποσότητα του δείγματος, αλέθονται σε μύλο εν ξηρώ έως μεγίστης διαμέτρου κόκκων 1mm και εν συνεχεία ομογενοποιούνται μαζί με νερό. Εάν η ποσότητα του δείγματος υπερβαίνει τα 3Kg, η ομογενοποίηση μαζί με το νερό γίνεται στον ομογενοποιητή επί 4-5min. Εάν η ποσότητα, του δείγματος είναι μικρή (<3Kg ),η ομογενοποίηση μαζί με το νερό γίνεται με ανάδευση με κουτάλι ή σπάτουλα σε πλαστικό δοχείο ή λεκάνη επί 9-10 min. Εάν η ποσότητα του δείγματος είναι πολύ μικρή (<300g) ,τότε η ομογενοποίηση μαζί με το νερό δύναται να γίνει άμεσα σε blender οικιακού τύπου επί 1 -2 min.

#### 4.2.2. Άλεση - Ομογενοποίηση δειγμάτων με βρώσιμο ή μη βρώσιμο τμήμα

Δείγματα, όπως είναι οι αραχίδες (με ή χωρίς κέλυφος), τα κελυφωτά φυστίκια (με ή χωρίς κέλυφος), τα αμύγδαλα (χωρίς κέλυφος), τα καρύδια (χωρίς κέλυφος και ξυλώδη μέρη), τα φουντούκια (με ή χωρίς κέλυφος), τα στραγάλια, οι ηλιόσποροι (με ή χωρίς κέλυφος), οι κολοκυθόσποροι (με ή χωρίς κέλυφος), τα ξηρά βερύκοκκα (χωρίς κουκούτσια) και τα ξηρά σύκα, τα οποία, δεν έχουν μεγάλη σκληρότητα και η ποσότητα τους υπερβαίνει τα 3Kg, αλέθονται και ταυτόχρονα ομογενοποιούνται μαζί με νερό στον ομογενοποιητή επί 20~30 min.

#### 4.2.3. Άλεση - Ομογενοποίηση δειγμάτων με μικρό βάρος

Δείγματα με μικρό βάρος (<3Kg) αλέθονται αρχικά εν ξηρώ σε blender οικιακού τύπου και εν συνεχεία ομογενοποιούνται μαζί με νερό με ανάδευση με κουτάλι ή σπάτουλα σε πλαστικό δοχείο ή λεκάνη επί 9-10 min. Δείγματα με πολύ μικρό βάρος (<300g) δύνανται να αλεστούν άμεσα μαζί με νερό, σε blender οικιακού τύπου επί 2-3 min.

#### 4.2.4. Άλεση - Ομογενοποίηση δειγμάτων σε μορφή πολτού

Προϊόντα, τα οποία βρίσκονται ήδη σε μορφή πολτού εκ φύσεως ή εκ παρασκευής όπως είναι το ταχίνι (σησαμόπολτος) και το φυστικοβούτυρο (αραχιδοπολτός), ομογενοποιούνται άμεσα με νερό ανάλογα με το βάρος του δείγματος.

#### 4.2.5. Ζύγιση ποσοτήτων δείγματος και νερού

Οι ποσότητες του δείγματος και του νερού ζυγίζονται ως εξής :

Ποσότητες βάρους έως και 2.5Kg ζυγίζονται σε ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων, ποσότητες μεγαλύτερου βάρους ζυγίζονται σε ζυγό ενός δεκαδικού ψηφίου.

Αρχικά ζυγίζεται η ποσότητα του δείγματος .

Με βάση την κατάλληλη για την ομογενοποίηση αναλογία βάρους δείγματος προς βάρος νερού (δ), υπολογίζεται η ποσότητα του νερού του απαιτούμενου για την δημιουργία του πολτού του δείγματος :

(ποσότητα απαιτούμενου νερού σε gr) = (ποσότητα δείγματος σε gr) / δ

Η ανωτέρω υπολογισθείσα ποσότητα απαιτούμενου νερού ζυγίζεται με μέγιστο αποδεκτό εύρος  $\pm 1\%$ , όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα :

**Πίνακας Β:**

Υπολογισθείσα ποσότητα νερού	Ζυγιζόμενη ποσότητα νερού
> 5Kg	Η υπολογισθείσα ποσότητα απαιτούμενου νερού) + - 50 gr
0.5 Kg – 5 Kg	Η υπολογισθείσα ποσότητα απαιτούμενου νερού) + -5 gr
<500 gr	Η υπολογισθείσα ποσότητα απαιτούμενου νερού) + -0.5 gr

Καταγράφονται τα βάρη δείγματος και νερού και υπολογίζεται η αναλογία αυτών ( $\delta$ ). Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη αναλογία είναι:  $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / ((\text{βάρος νερού}) = 2/3$ .

#### 4.3. Υποδειματοληψία

Αμέσως μετά το πέρας της ομογενοποίησης ποσότητα πολτού έως 1 Kg αλέθεται και ομογενοποιείται περαιτέρω σε blender οικιακού τύπου επί 1-2 min. Από τον τελικό πολτό του δείγματος λαμβάνονται σε έναν ή περισσότερους υάλινους περιέκτες από περίπου 200gr (ή ολόκληρη σχεδόν η ποσότητα του πολτού στις περιπτώσεις δειγμάτων μικρού βάρους για ανάλυση. Εάν η ανάλυση δεν προβλέπεται να αρχίσει αυθημερόν, τότε ο πολτός φυλάσσεται σε κατάψυξη ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Όταν πρόκειται για δείγματα τελωνειακά, τα οποία έχουν ληφθεί σύμφωνα με την Οδηγία 1998/53 Ε.Ε.(Παράρτημα IV), κατά την διαδικασία της άλεσης –ομογενοποίησης-υποδειματοληψίας συντάσσεται εις διπλούν το "Πρωτόκολλο Δειγματοληψίας"(Παράρτημα III) για την εφαρμογή της Οδηγίας 98/53 Ε.Ε.(Παράρτημα IV), το οποίο αρχειοθετείται, μαζί με όλα τα σχετικά έγγραφα του δείγματος, στο κατά περίπτωση δείγματος κατάλληλο Αρχείο Εκθέσεων Εξέτασης. Ανάλογης διατύπωσης έντυπο συντάσσεται και στην

περίπτωση δειγμάτων αρτυμάτων, τα οποία έχουν ληφθεί σύμφωνα με την Οδηγία 2002/27Ε.Ε.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

### 5. ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

#### 5.1. Εκχύλιση

Εκχύλιση γίνεται ώστε ένα στερεό ή υγρό μίγμα να παραληφθεί με έναν άλλο υγρό διαλύτη, υδατικό ή οργανικό, στον οποίο η διαλυτότητα του εκχυλιζόμενου συστατικού να είναι μεγαλύτερη από αυτήν που έχει στο μίγμα.

Η εκχύλιση γίνεται με ανάμειξη και ανατάραξη καθορισμένης ποσότητας δείγματος με τον διαλύτη εκχύλισης, ακολουθεί διήθηση για τον διαχωρισμό.

Συνήθεις διαλύτες εκχύλισης είναι ο αιθέρας, ο πετρελαϊκός αιθέρας, η αλκοόλη, το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη που χρησιμοποιείται στην περίπτωση των αφλατοξινών.

Η μέθοδος της εκχύλισης με μη πολικούς οργανικούς διαλύτες είναι η κατ'εξοχήν εφαρμοζόμενη για την παραλαβή των συνολικών λιποειδών από τα διάφορα φυτικά προϊόντα τα οποία περιέχουν τα λιπαρά ως βασικό συστατικό τους π.χ. από τους ελαιώδης σπόρους και καρπούς. Η εκχύλιση βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση των τροφίμων για την απομόνωση των συστατικών τους ή για τον προσδιορισμό των συστατικών τους που απομένουν μετά την εκχύλιση.

##### 5.1.1. Εκχύλιση των αφλατοξινών

Σε ευρύλαιμη υάλινη φιάλη ζυγίζονται  $m = 50 - 150$  gr πολτού του δείγματος σε ζυγό δύο δεκαδικών ψηφίων .

Εάν ο πολτός προέρχεται από κατάψυξη τότε πρέπει να αφεθεί να λάβει θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από οποιαδήποτε άλλη ενέργεια.

Παρατήρηση : Πριν από την ζύγιση ο πολτός αναδεύεται πολύ καλά (1-2min) με κουτάλι εντός του υάλινου περιέκτη του .

Προστίθενται. [(0.04.m) +0.2] gr στερεού NaCl, διότι κατακρατεί τις αφλατοξίνες και τις παρασύρει.

Εάν  $m=50\text{gr}$  τότε προστίθενται 2gr NaCl. Εάν  $m=100\text{gr}$ , τότε προστίθενται 4gr NaCl.

Εάν  $m=150\text{ gr}$ , τότε προστίθενται 6gr NaCl.

Προστίθενται V ml MeOH p.a έτσι, ώστε να ισχύει (κατ' αριθμητική τιμή)  $V=m$ , δηλαδή προστίθενται τόσα ml MeOH p.a., όσα ήταν τα gr του πολτού που ζυγίστηκαν.

Ο όγκος V μετράται με ογκομετρικό κύλινδρο με προσέγγιση ακέραιας ένδειξης.

Ακολουθεί ομογενοποίηση, προς εκχύλιση των αφλατοξινών. Η ομογενοποίηση πραγματοποιείται με την συσκευή Ultra Turrax σε υψηλή ταχύτητα επί 1-2 min.

Σε περιπτώσεις πολτού, οι οποίοι περιέχουν ξυλώδη ή εξαιρετικά σκληρά τεμαχίδια (π.χ. πολτός από κελυφωτά φυστίκια ή πολτός από αραβόσιτο) δεν χρησιμοποιείται η συσκευή καθώς είναι δυνατόν να υποστεί σημαντική βλάβη, αλλά γίνεται απλή συνεχής ανάδευση (χειροκίνητα ή σε μαγνητικό αναδευτήρα επί 15-16 min. Τέλος ακολουθεί διήθηση από χάρτινο ηθμό (σκληρό και πτυχωτό).

Το διήθημα συλλέγεται σε υάλινη φιάλη με εσφυρισμένο πώμα.

#### 5.1.2. Καθαρισμός του εκχυλίσματος μέσω ανοσοχημικής στήλης

Καθορισμένος όγκος εκχυλίσματος φέρεται σε ποτήρι ζέσεως και προστίθεται ποσότητα μεθανόλης και νερού ώστε το διάλυμα στο ποτήρι ζέσεως να είναι 50 ml και η ποσότητα της μεθανόλης να μην ξεπερνά το 12,5%. Το άθροισμα  $V_{IAC}+V_M+V_N$  (του όγκου σε ml εκχυλίσματος του δείγματος, ο οποίος διήλθε από την ανοσοχημική στήλη, του όγκου της MeOH σε ml και του όγκου του νερού σε ml) ισούται με 50ml.

Προστίθεται 1-2 σταγόνες διαυγαστικού διαλύματος Captez I στο ποτήρι ζέσεως και αναδεύεται το περιεχόμενο του. Ακολούθως προστίθενται ισάριθμες σταγόνες διαυγαστικού διαλύματος Captez II, αναδεύεται πάλι το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως και αφήνεται σε ηρεμία επί 1-2 min προς διαύγαση. Εν τω μεταξύ τοποθετούμε στον πυθμένα της πλαστικής σύριγγας ποσότητα βάμβακος, έτσι ώστε να καλύπτεται πλήρως ο πυθμένας της σύριγγας και να σχηματίζεται στρώση ύψους 8-10mm. Το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως μεταφέρεται στην πλαστική σύριγγα και διηθείται δια του στρώματος βάμβακος. Έπειτα διέρχεται από ανοσοχημική στήλη η οποία περιέχει αντισώματα για την δέσμευση των αφλατοξινών. Όταν ολοκληρωθεί η διήθηση συμπιέζεται ελαφρά το στρώμα βάμβακος με το έμβολο της σύριγγας ώστε να ελαχιστοποιηθεί η κατακράτηση υγρού στη μάζα του βάμβακος. Όταν όλο το υγρό έχει διέλθει από την ανοσοχημική στήλη, ακολουθεί έκπλυση

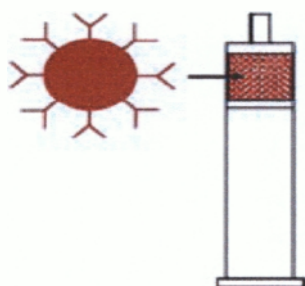
της με 20-25 ml νερού με μεγαλύτερη ροή (4-5ml/min). Στο τέλος της έκλυσης επιδιώκεται η ταχεία διέλευση αέρα από την ανοσοχημική στήλη επί μερικά δευτερόλεπτα, ώστε να καταστεί το πληρωτικό υλικό της κατά το δυνατό στεγνό. Σε περίπτωση συσσώρευσης του πληρωτικού υλικού στον πυθμένα της ανοσοχημικής στήλης (λόγω της υψηλής ροής κυρίως κατά την έκπλυση) με ελαφρά κτυπήματα της ανοσοχημικής στήλης επιδιώκεται ο θρυμματισμός του "συσσωματωμένου" πληρωτικού υλικού, ώστε να διευκολυνθεί η εν συνεχεία ανάκτηση των αφλατοξινών.

Ακολούθως, οι αφλατοξίνες που έχουν κατακρατηθεί στο πληρωτικό υλικό της ανοσοχημικής στήλης, παραλαμβάνονται σε διακριβωμένο αριθμημένο ογκομετρικό σωλήνα, εκλούόμενες με 2 ml μεθανόλης.

Τέλος το μεθανολικό διάλυμα αφλατοξινών, το οποίο λαμβάνεται από την ανοσοχημική στήλη αραιώνεται με περίπου ίσον όγκο απεσταγμένου νερού, ώστε να προκύψει ένα διάλυμα συγκεκριμένου τελικού όγκου (4ml). Συγκεκριμένος ενέσιμος όγκος αυτού του διαλύματος εισάγεται στο σύστημα HPLC που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2

\* Οι διαδικασίες της παρούσας παραγράφου, πραγματοποιήθηκαν σε υάλινο θάλαμο κενού SPE ( παράγραφος 3.6.).

**Σχήμα 1 :** Η ανοσοχημική στήλη περιέχει αντισώματα



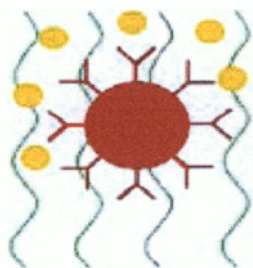
**Σχήμα 2:** Το φιλτραρισμένο και αραιωμένο απόσπασμα οργανώνεται μέσω της στήλης ανοσοσυγγένειας.



**Σχήμα 3:** Σύζευξη αφλατοξίνης στο αντίσωμα

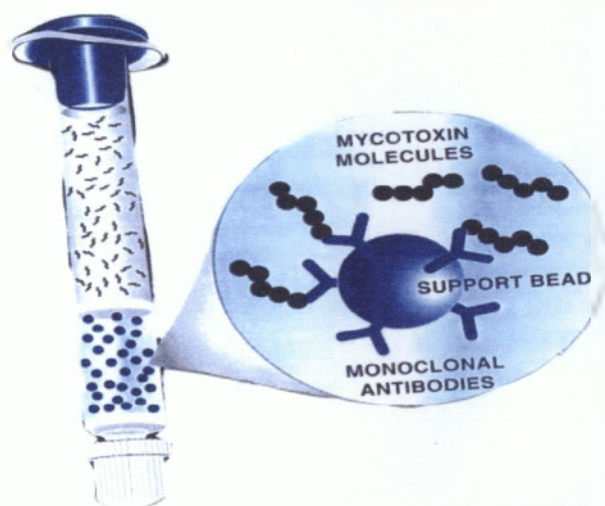


**Σχήμα 4:** Αφαίρεση μυκοτοξίνης με εξαγωγή μεθανόλης



### 5.1.3. Ανοσοχημική στήλη – Τενική ELISA

**Τεχνική ELISA:** Ο οίκος Vicam παράγει διαγνωστικά kits για την ανίχνευση αφλατοξινών (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>).



Η μέθοδος βασίζεται στην απομόνωση των μυκοτοξινών από το προς ανάλυση δείγμα με στήλες χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας (Immunoaffinity columns) με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων, προσδεδεμένων στο χρωματογραφικό υλικό (Immunoaffinity chromatography).

#### Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

- Ταχύτης (10-15 λεπτά).
- Απλή στην εκτέλεση.
- Ευαίσθητη.
- Πολλαπλών εφαρμογών (ποικιλία δειγμάτων).
- Ασφαλής (δεν χρησιμοποιούνται τοξικά υλικά).

## 5.2. Ανάλυση με HPLC/PCD/FD

Το μεθανολικό διάλυμα αφλατοξινών, το οποίο λαμβάνεται από την ανοσοχημική στήλη αραιώνεται περίπου με ίσον όγκο απεσταγμένου νερού ώστε να προκύψει ένα διάλυμα συγκεκριμένου τελικού όγκου  $V_{LC}$  (=4ml) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λίγο πριν από την εισαγωγή του στο HPLC/PCD/FD για χρωματογραφική ανάλυση.

Για τη λειτουργία του συστήματος HPLC/PCD/FD ακολουθείται η SOP 20 02 02 001.

### 5.2.1. Ενδεικτικές παράμετροι λειτουργίας του συστήματος

**Στήλη HPLC:** WATERS Symmetry ή άλλη με ισοδύναμα αποτελέσματα διαχωρισμού κορυφών.

**Κινητή φάση:** Τετραϋδροφουράνιο/Απεσταγμένο νερό (21+-1) / (79+-1). Παρασκευάζεται με ανάμειξη κατάλληλων όγκων τετραϋδροφουρανίου και νερού, σύμφωνα με την ανωτέρω αναλογία αρχικών όγκων και χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν ο τελικός ογκος του μείγματος.

**Ροή κινητής φάσης:** 0,5ml/min.

**Θερμοκρασία στήλης:** θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Όγκος ένεσης:** 200 μl.



### 5.2.2. Δημιουργία παραγώγων των αφλατοξινών

Αντιδραστήριο σχηματισμού παραγώγων των αφλατοξινών μετά από την έκλυση τους από τη στήλη : κορεσμένο υδατικό διάλυμα ιωδίου ( παράγραφος 3.5.).

**Ροή ιωδίου:** 0,2ml/min.

**Θερμοκρασία αντίδρασης με ιώδιο:** 75°C

**Χρόνος παραμονής:** 1,4ml/2min.

### 5.2.3. Φθορισμομετρικός ανιχνευτής

**Μήκος κύματος διέγερσης:** 362nm.

**Μήκος κύματος εκπομπής:** 454 nm.

### 5.2.4. Αυτόματος δειγματολήπτης

Προγραμματίζεται έτσι, ώστε να εκτελείται αυτοματοποιημένα η αλληλουχία ενώσεων.

Τα δείγματα και τα πρότυπα αναλύονται χρωματογραφικά με την παρακάτω αλληλουχία:

A) Ένεση πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών.

B) Έως και έξι ενέσεις δειγμάτων.

Γ) Ένεση πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών.

Δ) Έως και έξι ενέσεις δειγμάτων.

## 5.3 Ποσοτικοί υπολογισμοί

### 5.3.1. Ταυτοποίηση των αφλατοξινών.

Για την αναγνώριση των κορυφών των αφλατοξινών στο χρωματογράφημα ενός δείγματος συγκρίνονται οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης των αφλατοξινών στο χρωματογράφημα του δείγματος με τους αντίστοιχους σχετικούς χρόνους ανάσχεσης στα χρωματογραφήματα των προτύπων. Οι σχετικοί χρόνοι ανάσχεσης υπολογίζονται ως προς την αφλατοξίνη B 1 και απουσία αυτής ως προς την αφλατοξίνη G1 .

Ταυτοποιείται ως αφλατοξίνη μία κορυφή στο χρωματογράφημα του δείγματος όταν ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης της δεν διαφέρει περισσότερο από 0.02 από τον σχετικό χρόνο ανάσχεσης της αντίστοιχης κορυφής αφλατοξίνης στα χρωματογραφήματα των προτύπων .

### 5.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός αφλατοξινών

Η περιεκτικότητα του δείγματος ως προς κάθε μία αφλατοξίνη υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση :

$$C = (A_x / RF) \cdot [(V_{LC} \cdot f_{dil}) / V_{IAC}] \cdot \{ [(V/m) \cdot (1+(1/\delta))] + [(1/d_N) \cdot (1/\delta)] \} \cdot (100/rec)$$

και του συνόλου αφλατοξινών είναι :  $C_{total} = C_{B1} + C_{B2} + C_{G1} + C_{G2}$

**C** : είναι η περιεκτικότητα του δείγματος σε αφλατοξίνη, σε μg ανά Kg βρώσιμου μέρους του δείγματος.

**RF**: είναι ο συντελεστής απόκρισης (response factor) της αφλατοξίνης, ο οποίος υπολογίζεται από τα χρωματογραφήματα των προτύπων , οριζόμενος από την σχέση :  $RF = A_{std} / C_{std}$  όπου:

**A<sub>std</sub>** : είναι το εμβαδόν της κορυφής της αφλατοξίνης στο χρωματογράφημα του προτύπου (σε μονάδες απόκρισης x μονάδες χρόνου , όπως δίνεται από το λογισμικό του συστήματος).

**C<sub>std</sub>** : είναι η συγκέντρωση της αφλατοξίνης στο πρότυπο, σε ng/ml .

**A<sub>x</sub>**: είναι το εμβαδόν της κορυφής της αφλατοξίνης στο χρωματογράφημα του δείγματος (στις ίδιες μονάδες μέτρησης με το A<sub>std</sub>).

**V<sub>LC</sub>**: είναι ο όγκος (σε ml) του διαλύματος από το οποίο γίνεται η αρχική .πριν από οποιαδήποτε αραιώση , ένεση στο σύστημα HPLC/PCD/FD.

**F<sub>dil</sub>** : είναι ο συντελεστής αραιώσης του ανωτέρω διαλύματος όγκου V<sub>LC</sub>

**V<sub>IAC</sub>**: είναι ο όγκος (σε ml) του εκχυλίσματος του δείγματος , ο οποίος διήλθε από την ανοσοχημική στήλη

**V**: είναι ο όγκος (σε ml) της MeOH p.a. η οποία χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των αφλατοξινών του δείγματος.

**m** : είναι η μάζα (σε gr) του πολτού του δείγματος , η οποία ζυγίστηκε αρχικά.

**δ** : είναι η αναλογία βαρών δείγματος προς νερό, η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την δημιουργία του πολτού του δείγματος.

$d_N$ : είναι η πυκνότητα του νερού , η οποία θεωρείται σταθερή (=1 gr/ml) .

$\beta$ : είναι το επί τοις εκατό ποσοστό του βρώσιμου μέρους του δείγματος

$rec$ : είναι το επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης της αφλατοξίνης .

5.3.3. Υπολογισμός του συνόλου των αφλατοξινών .

Το σύνολο των αφλατοξινών  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  και  $G_2$  , που περιέχει το δείγμα , υπολογίζεται ως το άθροισμα των επιμέρους περιεκτικοτήτων (C) κάθε μίας αφλατοξίνης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

### 6. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΝΑΛΥΣΕΩΝ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΑ ΑΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ.

Κατά την διάρκεια του εξαμήνου, το Β' Τμήμα της Α'Χημικής Υπηρεσίας Πειραιά, δέχτηκε **259** δείγματα ξηρών καρπών, ξηρών φρούτων και δημητριακών για προσδιορισμό αφλατοξινών  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ . Εξ αυτών τα **154** δείγματα ήταν εισαγόμενα τελωνειακά, τα **79** ήταν αγορανομικά, τα **7** ιδιωτικές αναλύσεις, τα **14** για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας και **5** διεργαστηριακές αναλύσεις.

Η δειγματοληψία έγινε σύμφωνα με τον Κανονισμό 1525/98/ΕΚ για 154 δείγματα.

( Δηλαδή κάθε δείγμα αποτελείτο από τρία επιμέρους δείγματα βάρους 10kg ).

Το σύνολο των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών ήταν 462 ( δηλαδή  $3 \cdot 154 = 462$ ).

Ο έλεγχος στο εργαστήριο για την διαπίστωση της συμμόρφωσης του δείγματος έγινε σύμφωνα με τις διατάξεις των Κανονισμών 466/2001 και 27/2002 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Κατά την πρώτη εξέταση κρίθηκαν ακατάλληλα 11 Τελωνειακά δείγματα προϊόντα των οποίων η εισαγωγή στη χώρα απαγορεύτηκε ( 220 τόνοι) και 19 αγορανομικά εμπορεύματα δεσμεύτηκαν και απομακρύνθηκαν από την εσωτερική αγορά.

Τα ακατάλληλα προϊόντα βρέθηκαν σε ποσοστά:

- 7,2 % των τελωνειακών ( προϊόντα εισαγωγής ).
- 24% των αγορανομικών, (έλεγχος της εσωτερικής αγοράς).
- 28,6% των δειγμάτων ιδιωτικών αναλύσεων.

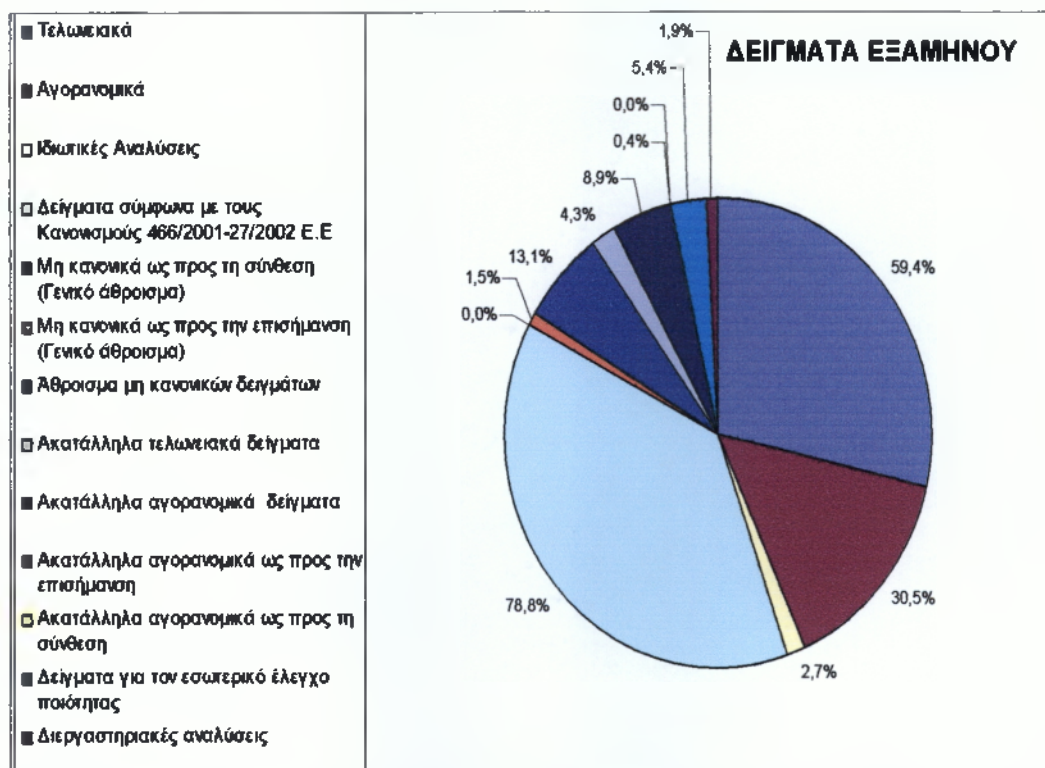
Ο Πίνακας Γ περιέχει τα αναλυτικά στοιχεία ανά κατηγορία αναλύσεων και τα ποσοστά ακατάλληλων δειγμάτων συνολικά και επιμέρους.

Ο Πίνακας Δ περιέχει τα ποσοστά των ακατάλληλων προσκομισθέντων τελωνειακών δειγμάτων ανά χώρα και είδος.

Στον Πίνακα Ε φαίνονται τα ποσοστά των ακατάλληλων αγορανομικών δειγμάτων ανά προϊόν.

## 6.1. Γράφημα ποσοστών, των δειγμάτων του εξαμήνου

Γράφημα Ι



Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζονται αναλυτικά τα στοιχεία ανά κατηγορία αναλύσεων και τα ποσοστά ακατάλληλων δειγμάτων συνολικά και επιμέρους .

6.2. Αναλυτικά στοιχεία ανά κατηγορία αναλύσεων και ποσοστά δειγμάτων

ΠΙΝΑΚΑΣ Γ

Δείγματα εξαμήνου	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό ως προς το σύνολο των δειγμάτων για προσδιορισμό αφλατοξινών
Σύνολο δειγμάτων για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών	259	-
B1, B2, G1, G2 ( Τελωνειακά +Αγορανομικά +Ιδιωτικές Αναλύσεις)		
Τελωνειακά	154	59,4%
Αγορανομικά	79	30,5%
Ιδιωτικές Αναλύσεις	7	2,7%
Δείγματα σύμφωνα με τους Κανονισμούς 466/2001-27/2002 Ε.Ε	204	78,8%
Μη κανονικά ως προς τη σύνθεση (Γενικό άθροισμα)	0	0,0%
Μη κανονικά ως προς την επισήμανση (Γενικό άθροισμα)	4	1,5%
Άθροισμα μη κανονικών δειγμάτων	34	13,1%
Ακατάλληλα τελωνειακά δείγματα	11	4,3%
Ακατάλληλα αγορανομικά δείγματα	23	8,9%
Ακατάλληλα αγορανομικά ως προς την επισήμανση	1	0,4%
Ακατάλληλα αγορανομικά ως προς τη σύνθεση	0	0,0%
Δείγματα για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας	14	5,4%
Διεργαστηριακές αναλύσεις	5	1,9%

### 6.3. Ποσοστά ακατάλληλων τελωνειακών δειγμάτων ανά χώρα και είδος

#### ΠΙΝΑΚΑΣ Δ

Αποτελέσματα αναλύσεων διαφορετικών υποστρωμάτων από έλεγχο κατά εισαγωγή

Είδος	Αριθμός δειγμάτων	Ακατάλληλα δείγματα	Ποσοστό ακατάλληλου προϊόντος	Ποσοστό ακατάλληλου προϊόντος ανά χώρα προέλευσης
Αλεύρι	1	-	0%	0% Αιθιοπία
Αραβόσιτος	7	-	0%	0% Η.Π.Α, 0% Αργεντινή
Αραχίδες	20	3	15%	15% Κίνα,
Αμύγδαλα	15	2	13,33%	13,33% Τυνησία, 0% Τουρκία
Πιστάκια	25	5	20%	20% Η.Π.Α
Σιτάρι	34	-	0%	0% Ρωσία 0% Καζακστάν 0% Βουλγαρία
Σταφίδα	8	-	0%	0% Ιράν 0% Τουρκία 0% Αφγανιστάν 0% Κρήτη 0% Χιλή 0% Η.Π.Α
Ρύζι	10	-	0%	0% Πακιστάν 0% Η.Π.Α 0% Μπαγκλαντές 0% Ταϊλάνδη 0% Ινδία
Βερούκοκκα	1	-	0%	0% Τουρκία
Δαμάσκηνα	3	-	0%	0% Η.Π.Α 0% Χιλή 0% Σερβία
Ηλιόσποροι	5	1	0,20%	0,20 % Συρία 0% Η.Π.Α 0% Κίνα 0% Αργεντινή
Κολοκυθόσποροι	3	-	0%	0% Κίνα
Κουκουνάρι	1	-	0%	0% Κίνα
Καρύδια	5	-	0%	0% Ινδία 0% Κίνα 0% Ρουμάνια
Κάσιους	6	-	0%	0% Ινδία
Μακαντάμια	2	-	0%	0% Ν. Αφρική
Προϊόν δημητριακών	1	-	0%	0% Η.Π.Α
Πιπέρι άσπρο	1	-	0%	0% Μαλαισία
Πιπέρι μαύρο	5	-	0%	0% Μαλαισία 0% Βιετνάμ
Προϊόν από καλαμπόκι	1	-	0%	0% Η.Π.Α
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>154</b>	<b>11ΜΚ</b>	<b>7,2%ΜΚ</b>	

## 6.4. Ποσοστά ακατάλληλων αγορανομικών δειγμάτων ανά προϊόν

## ΠΙΝΑΚΑΣ Ε

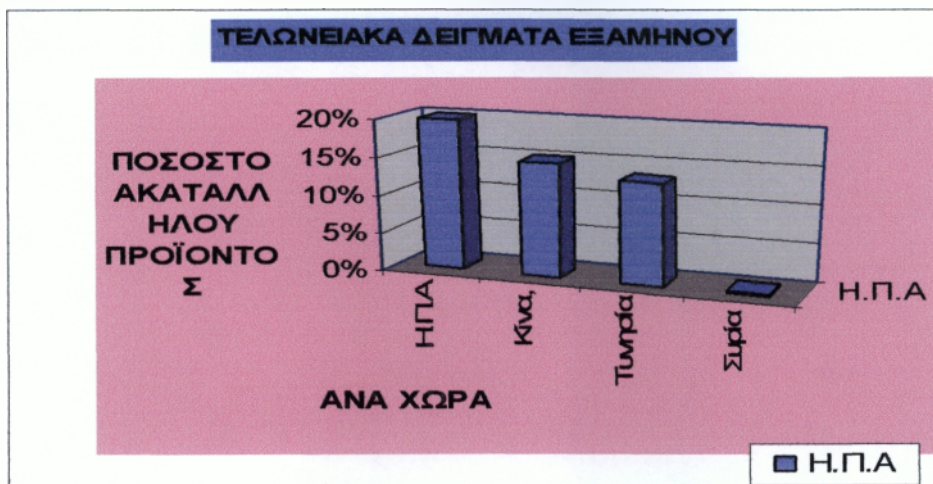
## ΑΓΟΡΑΝΟΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Αποτελέσματα αναλύσεων διαφορετικών υποστρωμάτων από διαφορετικές χώρες προέλευσης

Είδος Δείγματος	Συνολικός αριθμός	Ακατάλληλα δείγματα	% ακατάλληλου ανά χώρα
Αραχίδες	11	0%	0% Ρωσία
Αμύγδαλα	2		
Γαρύφαλλο	1		
Δύσμος	1		
Ζωοτροφή	1		
Θυμάρι	1		
Μίγμα ξηρών καρπών	1		
Μοσχοκάρυδο	1	0%	0% Ελλάδα
Ξηρά σύκα	2		
Πυρήνες από βερίκο	1		
Κελυφωτά φυστίκια	39	19%	85% Ελλάδα, 5%Η.Π.Α 5%Τουρκία
Πιπέρι μαύρο	4		
Ρίγανη	1		
Σιρόπι σύκου	1		
Σταφίδες	8	0%	0% Ελλάδα
Χαμομήλι	1		
Τσάι βουνού	1		
Τίλιο	1		
Φουντούκια	1		
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>79</b>	<b>24%</b>	<b>19%</b>

#### 6.4.1. Τελωνειακά δείγματα εξαμήνου

Γράφημα II:



Στο παραπάνω γράφημα βλέπουμε ότι κατά τον έλεγχο σε τελωνειακά προϊόντα κατά τη διάρκεια του εξαμήνου, εντοπίστηκε σοβαρό πρόβλημα υψηλής συγκέντρωσης αφλατοξινών στα εξής προϊόντα εισαγωγής :στα κελυφωτά φυστίκια (το 20% αντιστοιχεί στις Η.Π.Α),στις αραχίδες (το 15% αντιστοιχεί στην Κίνα ),στα αμύγδαλα (το 13,3% αντιστοιχεί στην Τυνησία ) και στους ηλιόσπορους (το 0,20% αντιστοιχεί στη Συρία ).

Συνολικά κρίθηκαν ακατάλληλα 11 τελωνειακά δείγματα προϊόντα των οποίων η εισαγωγή στη χώρα απαγορεύτηκε (220 τόνοι).

Το εργαστήριο δέχτηκε προς ανάλυση τα συγκεκριμένα προϊόντα κι από άλλες χώρες σύμφωνα με τον ΠΙΝΑΚΑ Δ , αλλά όπως φαίνεται σοβαρό πρόβλημα αντιμετωπίζουν οι Η.Π.Α, η Κίνα, η Τυνησία, και η Συρία στα συγκεκριμένα προϊόντα.

#### 6.4.2. Αγορανομικά δείγματα εξαμήνου

Γράφημα III:



Στο παραπάνω γράφημα βλέπουμε ότι κατά τον έλεγχο σε αγορανομικά προϊόντα κατά τη διάρκεια του εξαμήνου, εντοπίστηκε σοβαρό πρόβλημα υψηλής συγκέντρωσης αφλατοξινών στα κελυφωτά φυστίκια.



Συνολικά κρίθηκαν ακατάλληλα 19 αγορανομικά δείγματα εκ των οποίων το 85% προερχόνταν από την Αίγινα, το 5% των κελυφωτών φυστικών προερχόνταν από τη Τουρκία και ένα 5% προέρχονταν από τις Η.Π.Α. Τα συγκεκριμένα εμπορεύματα δεσμεύτηκαν και απομακρύνθηκαν από την εσωτερική αγορά.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε όλα τα προς ανάλυση δείγματα η B<sub>1</sub> κυριαρχούσε ως προς την περιεκτικότητα σε μg/kg, ακολουθούσε η B<sub>2</sub>, ενώ η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εντοπιζόνταν σε μικρότερες πάντα ποσότητες.

## 6.5. Τεκμηρίωση της μεθόδου

Η τεκμηρίωση της αναλυτικής μεθόδου έγινε για τον προσδιορισμό των παρακάτω παραμέτρων: πρότυπες καμπύλες, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικού προσδιορισμού ανάκτηση.

Η διαδικασία της αναλυτικής μεθόδου στο εργαστήριο για την παραλαβή, την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αφλατοξινών περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια :

1<sup>ο</sup> Στάδιο : Εκχύλιση

2<sup>ο</sup> Στάδιο: Καθαρισμός ανοσοχημικής στήλης

3<sup>ο</sup> Στάδιο : Έκλουση και παραλαβή της αφλατοξίνης

4<sup>ο</sup> Στάδιο : Ανίχνευση και επιβεβαίωση της παρουσίας του συνόλου των αφλατοξινών

5<sup>ο</sup> στάδιο: Κορυφές αναφοράς ( peaks) και ποσοτικοί προσδιορισμοί

Για την ολοκλήρωση της έρευνας πραγματοποιήθηκαν:

- Σύγκριση μεθόδων για τον προσδιορισμό αφλατοξινών με διάφορους διαλύτες εκχύλισης, σε δείγμα αραβοσίτου.
- Πειραματισμοί – δοκιμές σε στείρο δείγμα καρυδόψιχας
- Επιμόλυνση στείρων δειγμάτων με πρότυπα διαλύματα αφλατοξινών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

### 7. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΕΣ

#### 7.1. Δείγμα τελωνειακό- Καρύδι

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC/PCD/FD

Αρχείο: c:\2005\af-165a.dat , af-165b.dat , af-165c.dat

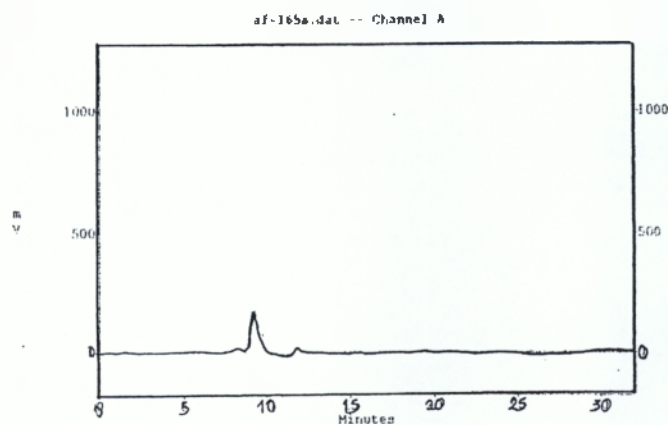
Μέθοδος : κωδ. 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος :020/020/165/2005

#### Channel A Αποτελέσματα

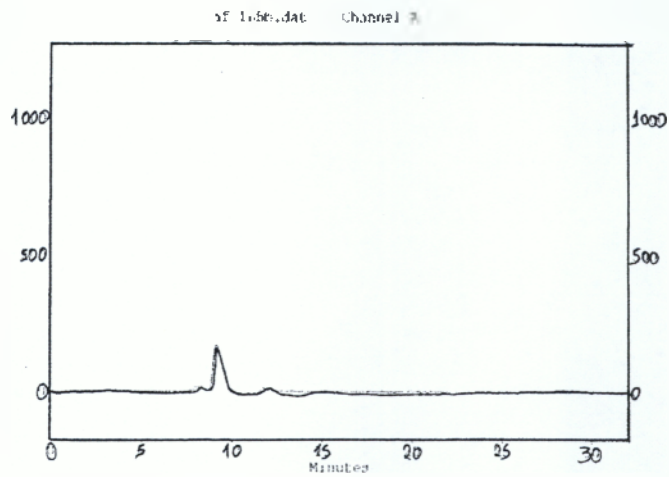
a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	14.70	0	0.00	0.00	0.00
2	B2	17.20	0	0.00	0.00	0.00
3	G1	19.30	0	0.00	0.00	0.00
4	B1	23.90	0	0.00	0.00	0.00

#### Channel A - Αποτελέσματα



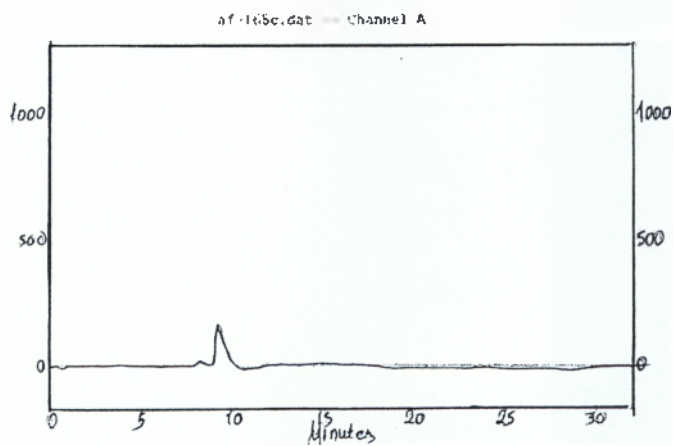
#### Channel A - Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	14.70	0	0.00	0.00	0.00
2	B2	17.20	0	0.00	0.00	0.00
3	G1	19.30	0	0.00	0.00	0.00
4	B1	23.90	0	0.00	0.00	0.00



### Channel A- Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	14.70	0	0.00	0	0.00
2	B2	17.20	0	0.00	0	0.00
3	G1	19.30	0	0.00	0	0.00
4	B1	23.90	0	0.00	0	0.00



Στα παραπάνω χρωματογραφήματα (af165a.dat, af165b.dat, af165c.dat--Channel A) βλέπουμε να απουσιάζουν οι B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>,G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>.

Το εμβαδό κορυφής είναι μηδενικό για κάθε μια αφλατοξίνη.

Η έκλυση του προτύπου σταμάτησε στα 23.90min για την B<sub>1</sub>,στα 17.20 min για την B<sub>2</sub>,στα 19.30 min για την G<sub>1</sub> και στα 14.70 min για την G<sub>2</sub>.

Η κορυφή που βλέπουμε είναι του προτύπου.

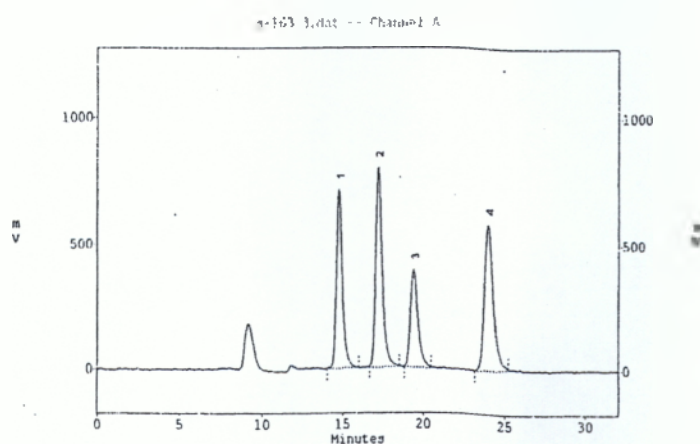
#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC/PCD/FD

Αρχείο : c:\2005\s-163-3.dat -- Channel A :

Μέθοδος : κωδ. 20 02 ΑΦΛ 04

#### Channel A -Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	14.73	14355019	24.46	550199	0.61
2	B2	17.20	17634784	30.05	612073	0.72
3	G1	19.40	9745894	16.61	299625	0.81
4	B1	23.97	16947568	28.88	450936	1.00



Σύμφωνα με το παραπάνω χρωματογράφημα (s-163-3.dat -- Channel A)πρότυπο, έγινε η ταυτοποίηση των κορυφών ( εφαρμογή Super compare του λογισμικού του συστήματος) και οι υπολογισμοί ως προς τις συγκεντρώσεις.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα βλέπουμε τις κορυφές των τεσσάρων αφλατοξινών  $B_1+B_2+G_1+G_2$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (  $C_{std}$ ) οι οποίες εκφράζονται σε ng/ml.

Το εμβαδό κορυφής κάθε μιας αφλατοξίνης και ο χρόνος έκλουσης αυτών φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.

## 7.2. Δείγμα Αγορανομικό-Ρύζι

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC/PCD/FD

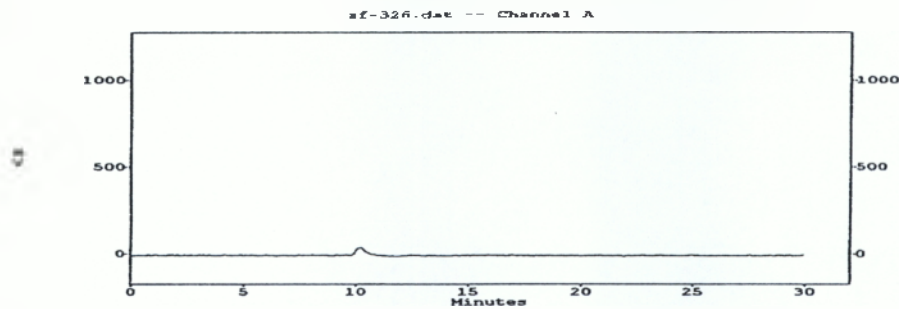
Αρχείο : c:\2005\af-326.dat -- Channel A

Μέθοδος : Κωδικός 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/326/2005/C

Channel A-Αποτελέσματα

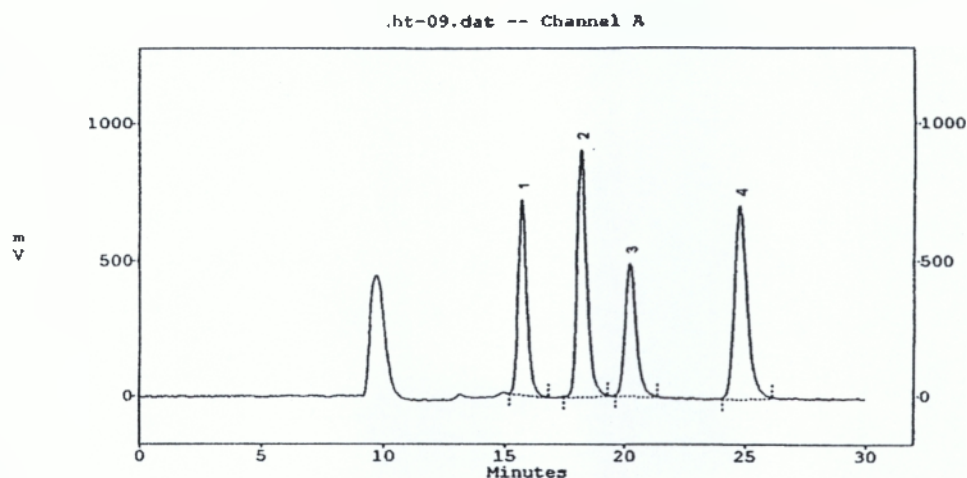
a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	15.70	0	0.00	0	0.00
2	B2	18.20	0	0.00	0	0.00
3	G1	20.20	0	0.00	0	0.00
4	B1	24.80	0	0.00	0	0.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af326.dat –Channel A) βλέπουμε ο χρόνος έκλουσης σταματά στα 24.80min για την B<sub>1</sub> , στα 18.20 min για την B<sub>2</sub>, στα 20.20 για τη G<sub>1</sub> και στα 15.70 min για την G<sub>2</sub>. Το εμβαδό της κορυφής κάθε μιας αφλατοξίνης είναι 0.

Channel A- Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	15.70	14 259725	21.36	55138	0.63
2	B2	18.20	19 868740	2.976	69 9396	0.73
3	G1	20.23	12 393587	18.56	378 364	0.82
4	B1	24.77	20 238752	30.32	54 870	1.00



Σύμφωνα με το παραπάνω χρωματογράφημα (ht-0.9.dat -- Channel A)πρότυπο, έγινε η ταυτοποίηση των κορυφών (εφαρμογή Super compare του λογισμικού του συστήματος) και οι υπολογισμοί ως προς τις συγκεντρώσεις.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα βλέπουμε τις κορυφές των τεσσάρων αφλατοξινών B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ( C<sub>std</sub>) οι οποίες εκφράζονται σε ng/ml.

Το εμβαδό κορυφής κάθε μιας αφλατοξίνης και ο χρόνος έκλουσης αυτών φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.

### 7.3. Δείγμα Τελωνειακό -Καλαμπόκι

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΗPLC\PCD\FD

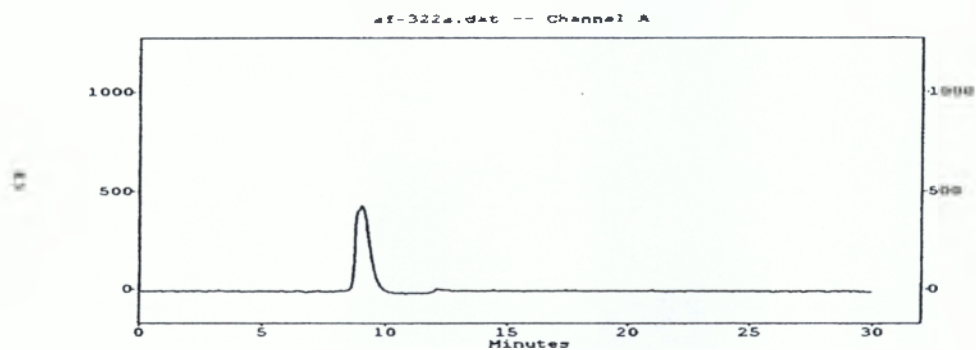
Αρχείο : c:\2005\af322a.dat, af322 b, c.dat

Μέθοδος: Κωδικός 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/322/2005

#### Channel A- Αποτελέσματα

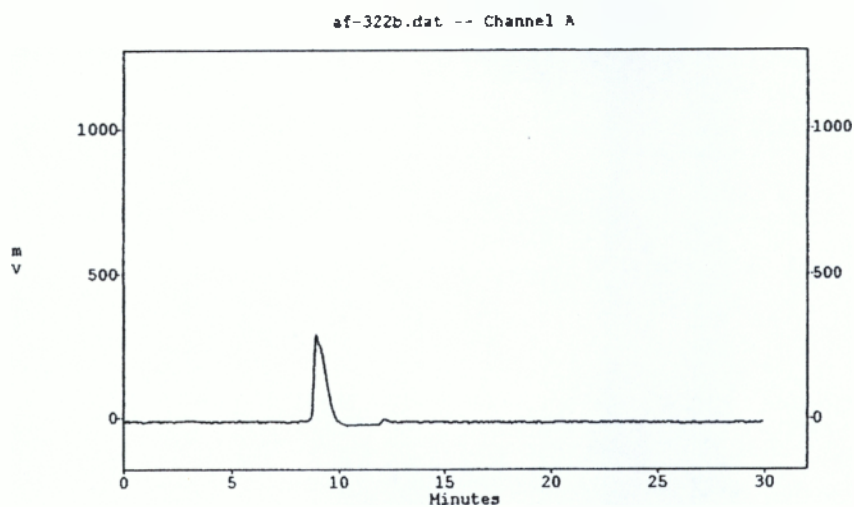
a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	14.60	0	0.00	0	0.00
2	B2	16.90	0	0.00	0	0.00
3	G1	18.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	22.90	0	0.00	0	0.00



#### Channel A-Αποτελέσματα

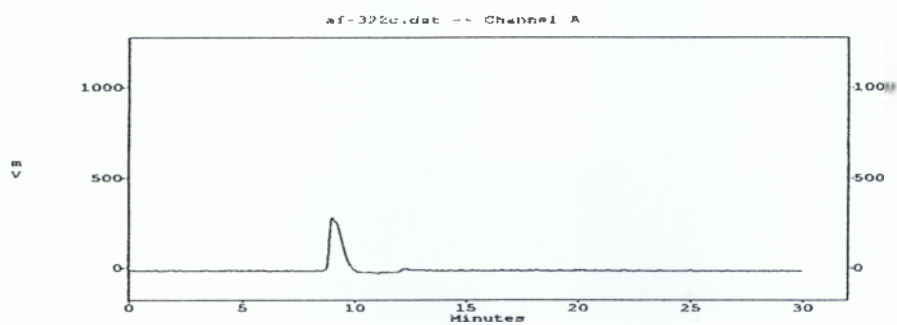
a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	14.60	0	0.00	0	0.00
2	B2	16.90	0	0.00	0	0.00
3	G1	18.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	22.90	0	0.00	0	0.00





#### Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	14.60	0	0.00	0	0.00
2	B2	16.90	0	0.00	0	0.00
3	G1	18.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	22.90	0	0.00	0	0.00



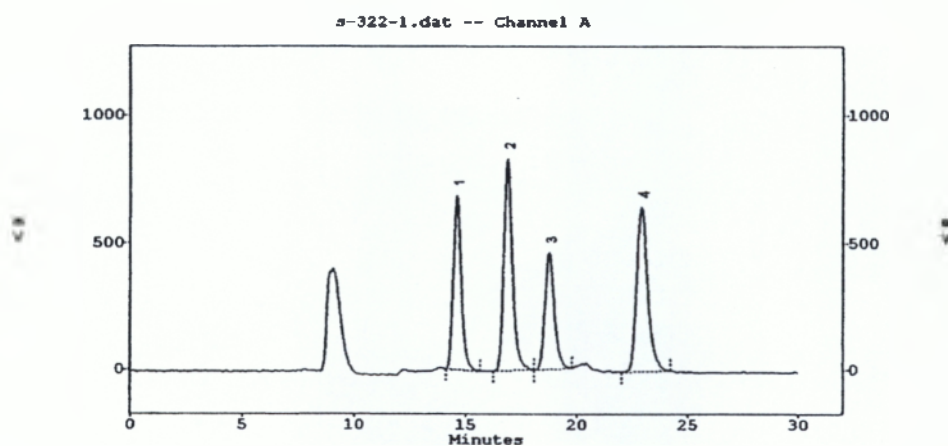
Στα παραπάνω χρωματογραφήματα (af322a.dat, af322b.dat, af322c.dat-- (ChannelA) βλέπουμε να απουσιάζουν οι B1,B2,G1,G2.Το εμβαδό κορυφής είναι μηδενικό για κάθε μια αφλατοξίνη.

Η έκλυση του προτύπου σταμάτησε στα 22.90min για την B1, στα 16.90 min για την B2, στα 18.80 min για την G1 και στα 14.60 min για την G2.

Η κορυφή που βλέπουμε είναι του προτύπου (s-322-1.dat).

#### Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Ret.RT
1	G2	14.60	12896759	22.23	527792	0.64
2	B2	16.90	17.300.314	29.81	641.807	0.74
3	G1	18.80	10.487.638	18.07	354.399	0.82
4	B1	22.90	17.342.876	29.89	500.692	1.00



Σύμφωνα με το παραπάνω χρωματογράφημα (s-322-1.dat -- Channel A) πρότυπο, έγινε η ταυτοποίηση των κορυφών (εφαρμογή Super compare του λογισμικού του συστήματος) και οι υπολογισμοί ως προς τις συγκεντρώσεις.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα βλέπουμε τις κορυφές των τεσσάρων αφλατοξινών B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (C<sub>std</sub>) οι οποίες εκφράζονται σε ng/ml.

Το εμβαδό κορυφής κάθε μιας αφλατοξίνης και ο χρόνος έκλυσης αυτών φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.

#### 7.4 Δείγμα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας – Αραβόσιτος

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC/PCD/PD

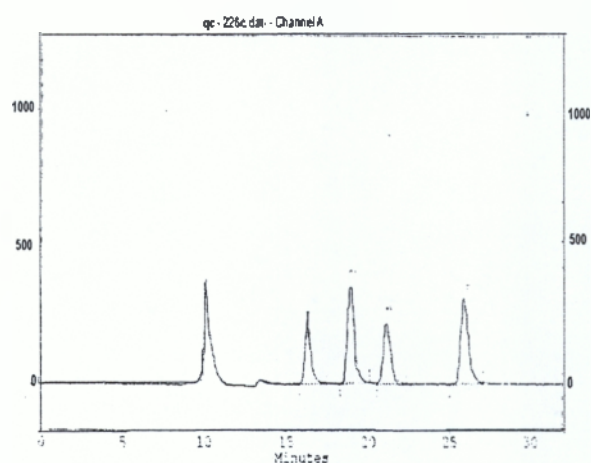
Αρχείο :c:\may\_2005\qc-226c.dat -- Channel A

Μέθοδος : Κωδικός 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος :020/020/226/2005/C

#### Channel A- Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	16.33	4380773	16.73	161013	0.63
2	B2	18.93	7992408	30.52	273544	0.73
3	G1	21.10	5487350	20.95	170783	0.82
4	B1	25.87	8328622	31.80	235770	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (qc-226c.dat-Channel A) βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 25.87min με εμβαδό κορυφής 83286 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 79924 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 18.93 min. Η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εμφανίζονται σε χρόνο 21.10 min και 16.33 αντίστοιχα, το εμβαδόν κορυφής τους είναι 54873 για την G<sub>1</sub> και 43808 για την G<sub>2</sub>. Η συγκέντρωση (C) σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04( Παράρτημα ΙΙ) για την B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub> είναι 1.1 µg/kg και 1.2 µg/kg αντίστοιχα, ενώ για την G<sub>1</sub> 1.2 µg/kg και 0.7 µg/kg για τη G<sub>2</sub>.

Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 20.5 µg/kg και 1.5 µg/kg αντίστοιχα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC/PCD/PD

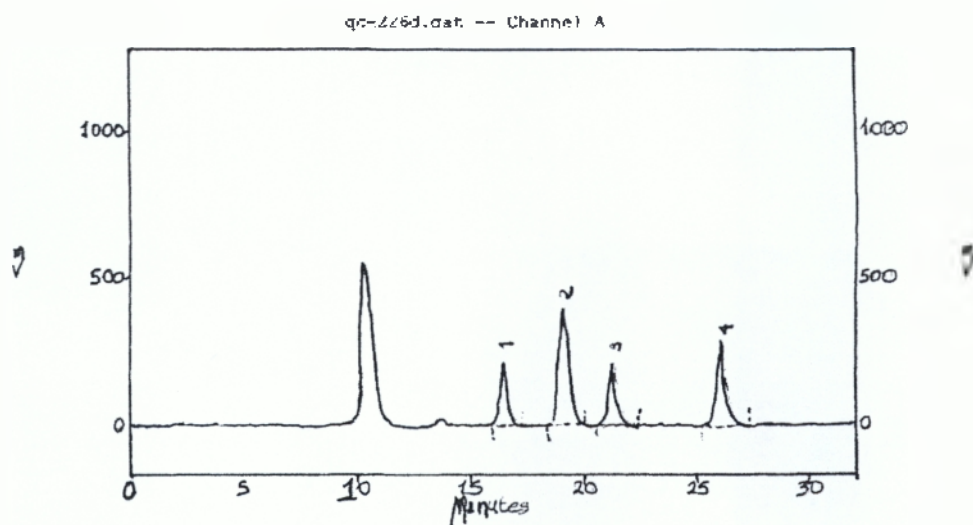
Αρχείο : c:\may\_2005\qc-226d.dat

Μέθοδος : 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/226/2005/D

Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	16.50	4443115	17.01	167416	0.68
2	B2	19.07	8601998	32.98	302756	0.73
3	G1	21.07	5288618	20.28	167742	0.82
4	B1	26.03	7746508	29.70	215372	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (qc-226d.dat –Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 26.03 min με εμβαδό κορυφής 77465 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 86020 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 19.07 min .Η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εμφανίζονται σε χρόνο 21.07 min και 16.50 αντίστοιχα , το εμβαδόν κορυφής τους είναι 52886 για την G<sub>1</sub> και 44431 για την G<sub>2</sub> .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04 ( Παράρτημα ΙΙ) ως προς το σύνολο των τεσσάρων αφλατοξινών είναι 4,00 µg/kg .

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC/PCD/PD

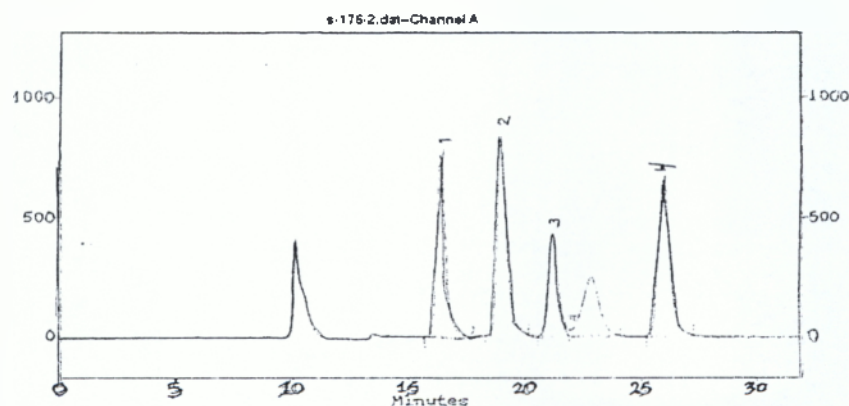
Αρχείο : c:\may\_2005\s-176-2.dat

Μέθοδος : 20 02 ΑΦΛ 04

Channel A- Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	16.40	16105526	21.85	591626	0.63
2	B2	18.97	18846000	25.57	646238	0.73
3	G1	21.17	10548309	14.31	333665	0.82
4	B1	25.93	18260238	24.78	506822	1.00

Channel A -Αποτελέσματα



Σύμφωνα με το παραπάνω χρωματογράφημα (s-176-2.dat -- Channel A)πρότυπο, έγινε η ταυτοποίηση των κορυφών ( εφαρμογή Super compare του λογισμικού του συστήματος )και οι υπολογισμοί ως προς τις συγκεντρώσεις.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα βλέπουμε τις κορυφές των τεσσάρων αφλατοξινών B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ( C<sub>std</sub>) οι οποίες εκφράζονται σε ng/ml.

Το εμβαδό κορυφής κάθε μιας αφλατοξίνης και ο χρόνος έκλουσης αυτών φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.

### 7.5. Δείγμα τελωνειακό- Κελυφωτά φυστίκια

Προσδιορισμός αφλατοξινών με HPLC(PCD\FD

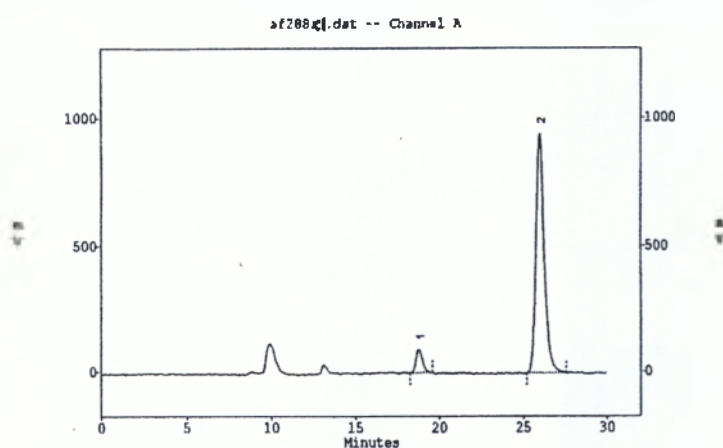
Αρχείο : c:\2005\af288c1.dat,c2,c3.dat

Μέθοδος : Κωδικός 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος: 020/020/288/2005/Γ

#### Channel A - Αποτελέσματα

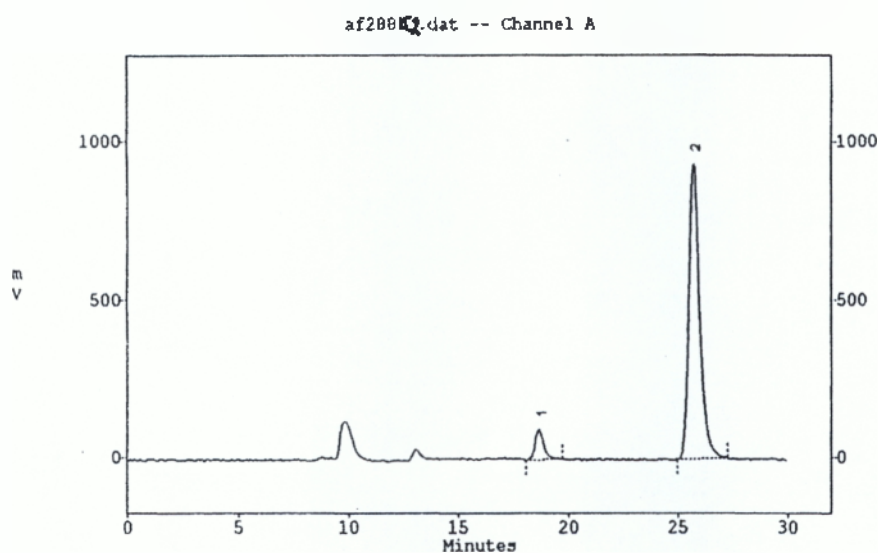
a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	16.17	0	0.00	0	0.00
2	B2	18.77	1938160	7.03	71767	0.72
3	G1	21.21	0	0.00	0	0.00
4	B1	25.93	25635400	92.97	727569	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af288c1.dat –Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 25.93 min με εμβαδό κορυφής 25635 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 19381 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 18.77 min .Η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εμφανίζονται σε χρόνο 21.21min και 16.17 αντίστοιχα , το εμβαδόν κορυφής τους είναι 0 .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04(Παράρτημα II) για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 22,0 μg/kg. Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 20,5 μg/kg και 1,5 μg/kg αντίστοιχα.

## Channel A-Αποτελέσματα

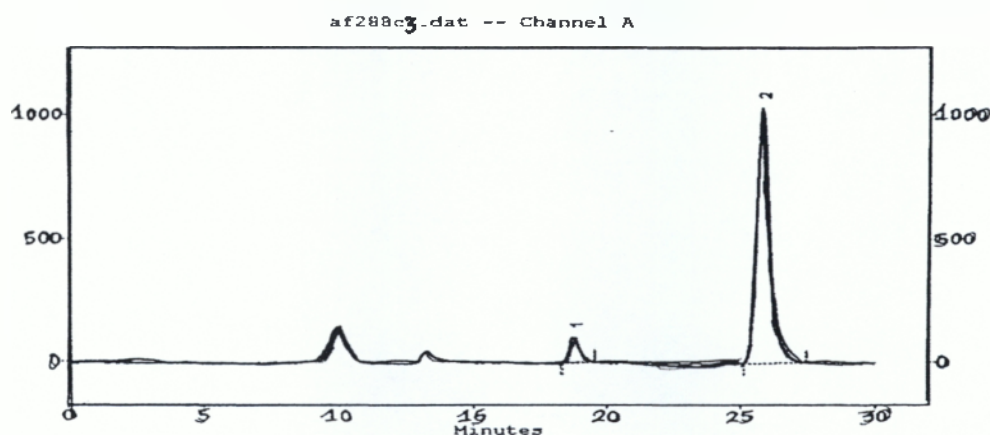
a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	16.17	0	0.00	0	0.00
2	B2	18.67	2001852	7.47	72705	0.73
3	G1	21.21	0	0.00	0	0.00
4	B1	25.73	24813618	92.53	717815	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af288c2.dat –Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 25.73 min με εμβαδό κορυφής 24814 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 20018 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 18.67min .Η G1 και η G2 εμφανίζονται σε χρόνο 21.21min και 16.17 αντίστοιχα , το εμβαδόν κορυφής τους είναι 0 .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04 (Παράρτημα ΙΙ) για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 21,4 μg/kg.Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 19,9 μg/kg και 1,6 μg/kg αντίστοιχα.

## Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	16.77	0	0.00	0	0.00
2	B2	18.77	2112971	7.16	78337	0.73
3	G1	21.21	0	0	0	0.00
4	B1	25.80	27386300	92.84	797024	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af288c3.dat –Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 25.80 min με εμβαδό κορυφής 27386 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 21130 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 18.77min .Η G1 και η G2 εμφανίζονται σε χρόνο 21.21min και 16.17 αντίστοιχα , το εμβαδόν κορυφής τους είναι 0 .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04 (Παράρτημα II) για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 23,6 µg/kg.Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B2 είναι 21.9 µg/kg και 1.6 µg/kg αντίστοιχα.



Προσδιορισμός αφλατοξινών με HPLC/PCD/AFD

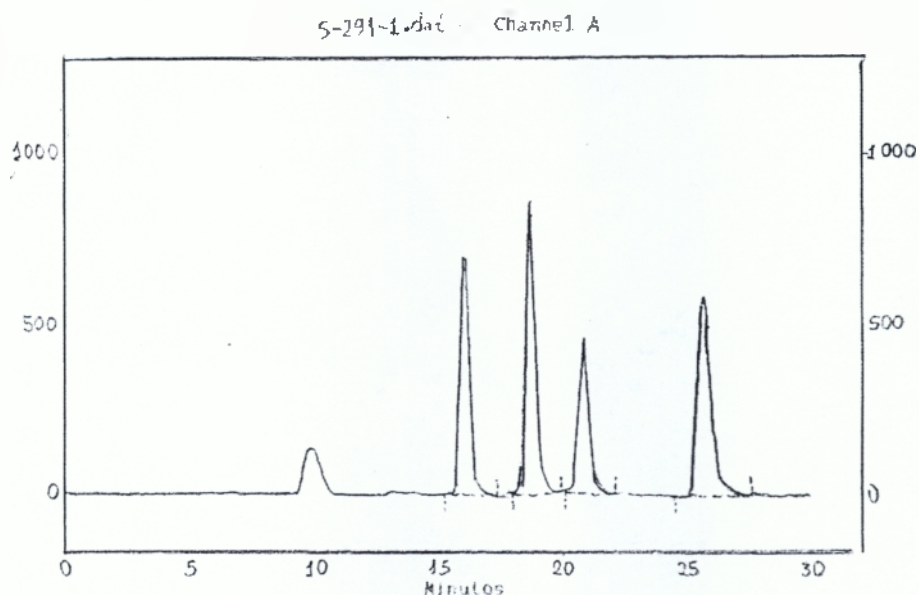
Αρχείο : c:\2005\s-291-1.dat

Μέθοδος : 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/288/2005/T

### Channel A - Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	15.93	14991556	23.97	522116	0.62
2	B2	18.60	18966948	30.33	662916	0.72
3	G1	20.80	11526784	18.43	347272	0.81
4	B1	25.67	17055930	27.27	451273	1.00



Σύμφωνα με το παραπάνω χρωματογράφημα (s-291-1.dat -- Channel A)πρότυπο, έγινε η ταυτοποίηση των κορυφών ( εφαρμογή Super compare του λογισμικού του συστήματος) και οι υπολογισμοί ως προς τις συγκεντρώσεις.

Στο παραπάνω χρωματογράφημα βλέπουμε τις κορυφές των τεσσάρων αφλατοξινών B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (C<sub>std</sub>) οι οποίες εκφράζονται σε ng/ml.

Το εμβαδό κορυφής κάθε μιας αφλατοξίνης και ο χρόνος έκλουσης αυτών φαίνονται στον παραπάνω πίνακα.

Αρ. Δείγματος Γ.Χ.Κ. 020/020/288/2005/Γ

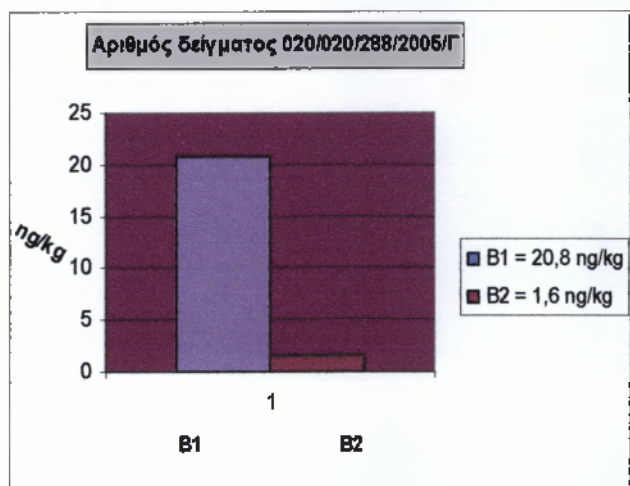
	c1	c2	c3	Μέση Τιμή
<b>B1:</b>	20,5	19,9	21,9	20,8
<b>B2:</b>	1,5	1,6	1,6	1,6
<b>G1:</b>	0	0	0	0
<b>G2:</b>	0	0	0	0
			<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>22,3</b>

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα το επιμέρους δείγμα Γ περιείχε 22,3 ng/kg

( η περιεκτικότητα εκφράζει το σύνολο των τεσσάρων αφλατοξινών).

Ο περιοριστικός παράγοντας για τα κελυφοτά φυστίκια είναι 10 μg/kg ( $B_1+B_2+G_1+G_2$ ) και ως προς τη B1 5 μg/kg βάσει του Καν.257/2002/ΕΚ.

Διάγραμμα Ι : περιοχής συγκεντρώσεων B1, B2



## 7.6. Δείγμα Τελωνειακό –αραχίδα

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC /PCD/FD

Αρχείο : c:\2005\af181ca.dat , Εκχύλιση με χλωροφόρμιο

Μέθοδος : 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/181/2005/C

### Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	18.30	0	0.00	0	0.00
2	B2	21.37	1831568	17.67	58540	0.73
3	G1	23.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	29.47	8533830	82.33	195503	1.00

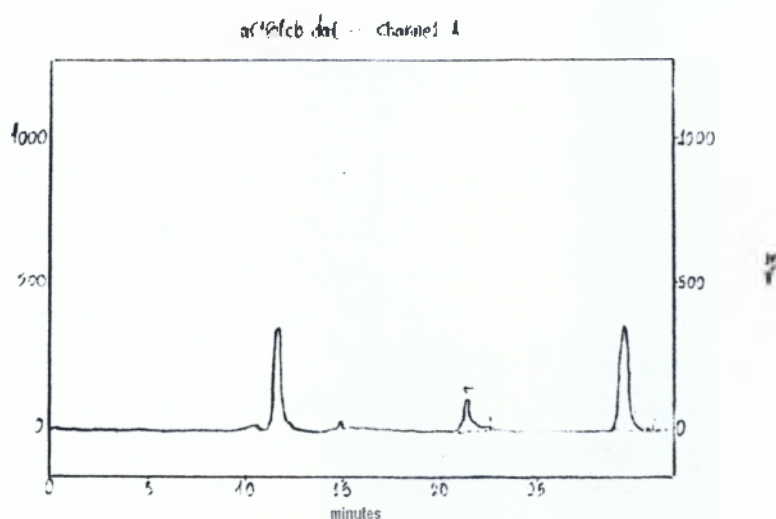


Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af181ca.dat , Εκχύλιση με χλωροφόρμιο-Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 29.47 min με εμβαδό κορυφής 85338 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 18315 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 21.37 min .Η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εμφανίζονται σε χρόνο 23.80min και 18.30 αντίστοιχα , το εμβαδόν κορυφής τους είναι 0 .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04(Παράρτημα ΙΙ) για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 22,0 μg/kg. Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 5,2 μg/kg και 0,9 μg/kg αντίστοιχα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC /PCD/FD  
 Αρχείο : c:\2005\af181cb.dat , Εκχύλιση με χλωρ+Γη Διατόμ  
 Μέθοδος : 20 02 ΑΦΛ 04  
 Αριθμός δείγματος : 020/020/181/2005/Γ

Channel A- Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret. Time	Area	Area%	Height	Rel. RT
1	G2	18.30	0	0.00	0	0.00
2	B2	21.40	2364227	17.30	73045	0.72
3	G1	23.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	29.53	11298525	82.70	274489	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af181cb.dat , Εκχύλιση με χλωροφόρμιο και γη διατόμων

-Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 29.53 min με εμβαδό κορυφής 11298 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 23642 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 21.40 min .Η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εμφανίζονται σε χρόνο 23.80min και 18.30 αντίστοιχα και το εμβαδόν κορυφής τους είναι 0 .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04(Παράρτημα ΙΙ) για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 22,0 µg/kg. Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 9,7 µg/kg και 1,6 µg/kg αντίστοιχα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC /PCD/FD

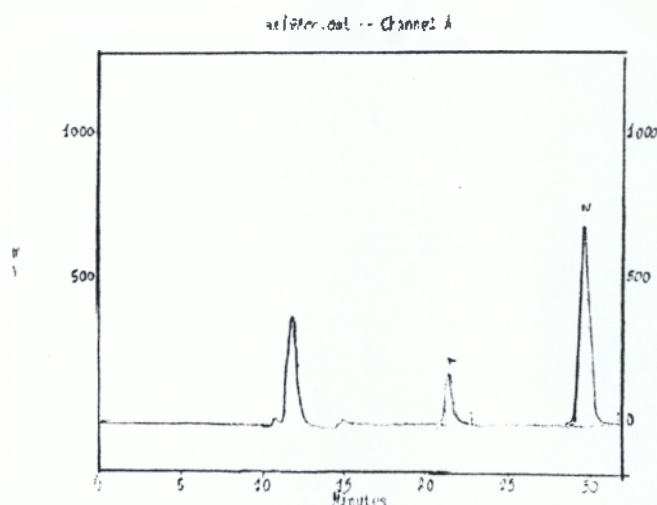
Αρχείο : c:\2005\af181cc.dat , Εκχύλιση με εξάνιο/MeOH -H<sub>2</sub>O

Μεθόδος : 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/181/2005/Γ

Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret. Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	18.30	0	0.00	0	0.00
2	B2	21.43	4302478	15.69	132653	0.72
3	G1	23.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	29.57	23127816	84.31	538391	1.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af181cc.dat , Εκχύλιση με εξάνιο στοιβάδα MeOH - H<sub>2</sub>O-Channel A)βλέπουμε την κορυφή της B<sub>1</sub>, όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 29.57 min με εμβαδό κορυφής 23127 και την κορυφή της B<sub>2</sub> με εμβαδό κορυφής 43024 όπου η HPLC μας έδωσε σε χρόνο 21.43 min .Η G<sub>1</sub> και η G<sub>2</sub> εμφανίζονται σε χρόνο 23.80min και 18.30 αντίστοιχα και το εμβαδόν κορυφής τους είναι 0 .Η συγκέντρωση (C)σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04(Παράρτημα II) για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι συνολικά 16.3 µg/kg . Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη για την B<sub>1</sub> και την B<sub>2</sub> είναι 14,2 µg/kg και 2,1µg/kg αντίστοιχα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ HPLC /PCD/FD

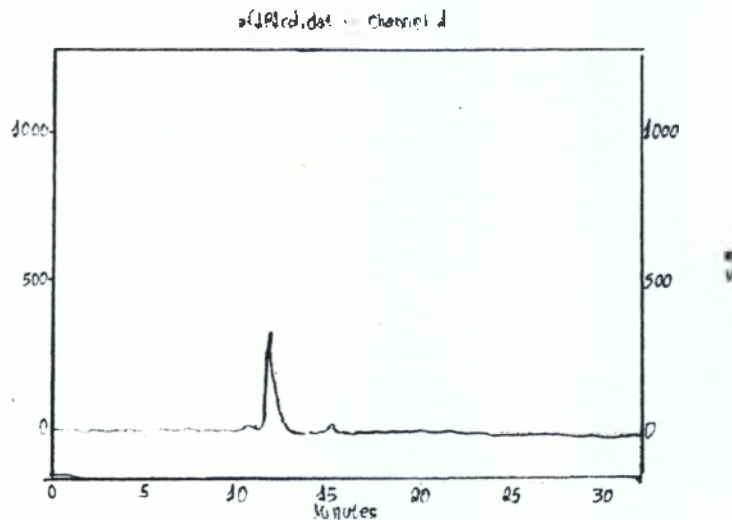
Αρχείο : c:\2005\af181cd.dat , Στοιβάδα εξανίου

Μέθοδος : 20 02 ΑΦΛ 04

Αριθμός δείγματος : 020/020/181/2005/Γ

Channel A-Αποτελέσματα

a/a	Name	Ret.Time	Area	Area%	Height	Rel.RT
1	G2	18.30	0	0.00	0	0.00
2	B2	21.20	0	0.00	0	0.00
3	G1	23.80	0	0.00	0	0.00
4	B1	29.30	0	0.00	0	0.00



Στο παραπάνω χρωματογράφημα (af181cd.dat , Εκχύλιση με εξάνιο στοιβάδα εξανίου -Channel A) παρατηρούμε ότι το εμβαδό κορυφής για κάθε μία αφλατοξίνη 0.

Η συγκέντρωση (C) σύμφωνα με το φύλλο εργασίας της μεθόδου 20 02 ΑΦΛ 04 (Παράρτημα ΙΙ) ως προς το σύνολο των τεσσάρων αφλατοξινών είναι 0.

Ο συγκεκριμένος διαλύτης δεν έδρασε θετικά

## 7.7. Παρατηρήσεις –σχόλια σχετικά με τη μέθοδο

Στις περιπτώσεις όπου είχαμε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα αφλατοξινών το προς ανάλυση διάλυμα (τελικού όγκου  $V_{LC}$ ) χρειάστηκε να αραιωθεί κατάλληλα με μείγμα  $M_eOH/H_2O$ , έτσι ώστε το λαμβανόμενο χρωματογράφημα να ικανοποιεί την αρχή της γραμμικότητας του συστήματος ως προς όλες τις αφλατοξίνες.

Κατά τις λήψεις των αναγκαίων όγκων για τις αραιώσεις των διαλυμάτων χρησιμοποιήσα βαθμονομημένη ψηφιακή σύριγγα.

Επίσης για την αναγνώριση των κορυφών των αφλατοξινών χρησιμοποιήσαμε την εφαρμογή "Super compare" του λογισμικού του συστήματος, η οποία δίνει τη δυνατότητα στον αναλυτή να επιθέτει (overlay) το χρωματογράφημα ενός δείγματος και το χρωματογράφημα ενός προτύπου και να τα αντιστοιχίζει (align) κορυφή προς κορυφή.

### 7.7.1. Πρότυπα διαλύματα

Λόγω της φωτοευαισθησίας των αφλατοξινών η διαδικασία της παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων έγινε αποφεύγοντας την άμεση έκθεση στο φυσικό ή τεχνητό φωτισμό.

Οι φιάλες και οι περιέκτες με τα πρότυπα διαλύματα ήταν πάντοτε καλυμένες με αλουμινόχαρτο ή άλλο διαφανές υλικό, έτσι αποφύγαμε την επίδραση του φωτός (UV) επί των αφλατοξινών.

Επίσης, λόγω της υψηλής τοξικότητας των αφλατοξινών η διαδικασία χειρισμού των πρότυπων διαλυμάτων την οποία ακολούθησα για την επίτευξη των επιθυμητών συγκεντρώσεων εργασίας, διεξάχθει εντός απαγωγού εστίας.

Τέλος, κατά τον χειρισμό των πρότυπων διαλυμάτων, των ανοσοχημικών στηλών όταν προέρχονται από κατάψυξη, απαιτείται να αφήνονται επί χρονικό διάστημα  $\frac{1}{2}$  ώρας, για να αποκτήσουν την θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση τους.

Παρεμποδίσεις κατά την εφαρμογή της μεθόδου δεν έχουν διαπιστωθεί.

## 7.8. Συμπεράσματα - Επιλογή συνθηκών κατεργασίας δειγμάτων

Μετά την τυποποίηση και τεκμηρίωση των χρωματογραφικών συνθηκών διερευνήθηκαν οι πλέον κατάλληλες συνθήκες για την κατεργασία των δειγμάτων ώστε η αφλατοξίνη αφ' ενός μεν να παραλαμβάνεται ποσοτικά, αφ' ετέρου δε το εκχύλισμα να είναι κατά το δυνατόν καθαρότερο και απαλλαγμένο από παρεμποδίζουσες ουσίες, οι οποίες επηρεάζουν τη χρωματογραφική ανάλυση.

Στην περίπτωση των περιβαλλοντικών δειγμάτων η φύση του δείγματος και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της εκχυλιζόμενης ένωσης είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες. Για παράδειγμα μη πολικοί ή λίγο πολικοί διαλύτες όπως το **κυκλοεξάνιο** και το **εξάνιο** χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση αλειφατικών υδρογονανθράκων και άλλων μη πολικών ρυπαντών όπως τα οργανοχλωρωμένα ή τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.

Το **χλωροφόρμιο** είναι οι συνηθέστερος διαλύτης για την εκχύλιση μη πολικών έως ενδιάμεσης πολικότητας οργανικών ρύπων.

Βιβλιογραφικά αναφέρεται, ότι συνήθεις διαλύτες εκχύλισης είναι ο αιθέρας, ο πετρελαϊκός αιθέρας, η αλκοόλη, το χλωροφόρμιο και η **μεθανόλη** που χρησιμοποιήσαμε στην περίπτωση των αφλατοξινών. Από τους οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι προτείνονται για την εκχύλιση των αφλατοξινών επιλέξαμε την μεθανόλη διότι μας έδωσε μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης και οι αφλατοξίνες καθίστανται περισσότερο διαλυτές σε αυτό το οργανικό μέσο εκχύλισης. Οι υπόλοιποι διαλύτες που δοκιμάστηκαν ( χλωροφόρμιο, εξάνιο, χλωροφόρμιο και γη διατόμων) έδωσαν μικρότερα ποσοστά εκχύλισης.

Η μέθοδος της εκχύλισης με μη πολικούς οργανικούς διαλύτες είναι η κατ' εξοχήν εφαρμοζόμενη για την παραλαβή των συνολικών λιποειδών από τα διάφορα φυσικά προϊόντα τα οποία περιέχουν τα λιπαρά ως βασικό συστατικό τους π.χ. από τους ελαιώδης σπόρους και καρπούς. Η εκχύλιση βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση των τροφίμων για την απομόνωση των συστατικών τους ή για τον προσδιορισμό των συστατικών τους που απομένουν μετά την εκχύλιση.

Θα πρέπει να τονισθεί ιδιαίτερα, ότι η διεξαγωγή των αναλύσεων αναλώθηκε στην ανάπτυξη και τεκμηρίωση της αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των αφλατοξινών με στόχο την όσο το δυνατό μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η ποιότητα των αναλυτικών δεδομένων μιας δοκιμής εξαρτάται τόσο από την ποιότητα της μεθόδου όσο και από την ποιότητα του αναλυτικού συστήματος.

Ακόμα, η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την απόδοση του αναλυτικού συστήματος κατά την εφαρμογή μιας συγκεκριμένης μεθόδου.



Για την τεκμηρίωση της μεθόδου προσδιορισμού των αφλατοξινών έγιναν οι παρακάτω βασικοί έλεγχοι και προσδιορισμοί.

- Τεκμηρίωση της μεθόδου σε δείγματα ξηρών καρπών
- Διασφάλιση ποιότητας - Ποιοτικός έλεγχος
- Όριο ανίχνευσης - Όριο ποσοτικού προσδιορισμού

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Αρβανιτογιάννης Ι.-Τζούρος Ν.2004**,Οδηγός Καταναλωτή για Ασφαλή Μεταχείριση Τροφίμων, Εκδόσεις Σταμούλη (ΚΕΦ.2,σελ.68-72).
- **David L. Eaton, John D. Groopman 1994**, Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance, Academic Press( pp.308-370)
- **Hamed K. Abbas. 1989**, Aflatoxin and Food Safety (Food Science and Technology) CRC Press (pp. 209-259).
- **Dvorackova Ivana. 1990**, Aflatoxin & Human Health, CRC Press
- **Miller J.D., Thenholm L. 1994**, Mycotoxin in Grain Compounds Other Than Aflatoxin, Eagan Press (pp.110-234).
- **J. W. Bennett.,M.Klich. 2003**, Mycotoxins, Clinical Microbiology Reviews,( p.497)
- **Groopman JD, Scholl P, and Wang JS 1996**, "Epidemiology of Human Aflatoxin Exposures and Their Relationship to Liver Cancer,"( pp. 211-222).
- **Cukrova V, Langrova E, and Akao M. 1991**,"Effects of Aflatoxin B1 on Myelopoiesis in Vitro," *Toxicology*, 70, (pp. 203-212).
- **Ross RK, Yuan J, Yu MC 1992**,"Urinary Aflatoxin Biomarkers and Risk of Hepatocellular Carcinoma," *Lancet*, (pp. 943-946).
- **Hendry KM, and Cole EC. 1993**, "A Review of Mycotoxins in Indoor Air," *Toxicol Environ Health*, (pp. 183-198).
  
- [http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/Fungal Biology/ chap8\\_im.htm](http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/Fungal%20Biology/chap8_im.htm)
- [http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/Fungal Biology/ chap7.htm](http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/Fungal%20Biology/chap7.htm)
- <http://www.aflatoxin.info/aflatoxin.isp>
- <http://pubmedcentral.nih.gov/pagerender.fcgi?...>
- [http://www.cifr.ncsu.edu/aspergillus flavus/](http://www.cifr.ncsu.edu/aspergillus%20flavus/)
- [http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/ pathogens/ A-f.html?...](http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/A-f.html?...)
- [www.cbs.knauv.nl/cbs\\_home/cbs\\_home.html?...](http://www.cbs.knauv.nl/cbs_home/cbs_home.html?...)
- <http://www.emedicine.com/med/topic2664.htm>
- [http://fao.org/documents/show\\_cdr.asp?...](http://fao.org/documents/show_cdr.asp?...)
- <http://www.ftc.agnet.org/library/image/pt2003012f1.html>
- <http://europa.eu.int/eur-lex/pri/oj/dat2002/...>
- <http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/diagnosis/FFmicro.pdf>
- <http://www.iita.org/news/aflax.htm>
- [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes=hyaline\)Aspergillus/flavus.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes=hyaline)Aspergillus/flavus.html)

- <http://www.mvcolog.com./chapter 21.htm>
- <http://www.dpi.qld.gov.au/field crops/3027.html>
- [http://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/feb97.html](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/feb97.html)
- <http://www.delcof.gr/technic.html>
- [http://www.uoi.gr/wed\\_lessons](http://www.uoi.gr/wed_lessons)
- <http://ianrpubs.unl.edu/plantdisease/g1408.htm>
- [www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/1996/10-7-1996/iaspergillus.html](http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/1996/10-7-1996/iaspergillus.html)
- [www.biospectrum.gr](http://www.biospectrum.gr)
- <http://www.mvcobook.com>
- <http://www.ilsil.org/file.../Best practices.pdf>
- [www.aflatoxin.info](http://www.aflatoxin.info)
- [http://livne.co.it/thesis/fungi\\_pictures/aspergillus](http://livne.co.it/thesis/fungi_pictures/aspergillus)
- <http://ianrpubs.unl.edu/plantdisease/g1408.htm>

**Συμπληρωματικό υλικό :** Στοιχεία από Γ.Χ.Κ Α'Χημική Υπηρεσία Πειραιά,  
 Ημερίδα με Θέμα: "Νέες Τεχνικές Ανάλυσης και Ανίχνευσης Μυκοτοξινών".  
 Στοιχεία από Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

**ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ , ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ,  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

Είδος δείγματος:	Καρύδια
Χώρα προέλευσης:	Ινδία
Αριθμός δείγματος Γ.Χ.Κ.:	020/020/165/2005

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμματικά* )

- Άλεση δείγματος καρυδόπιχας ( $\delta = (\text{βάρους δείγματος}) / (\text{βάρους νερού}) 1/1.5$ ).
- Ζύγιση δείγματος ( περίπου 70gr πολτού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε τρεις κωνικές φιάλες.
- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.
- af-165a.dat , af-165b.dat , af-165c.dat, s-163-3.dat ( πρότυπο).

---

Αποτελέσματα : **ΚΑΝΟΝΙΚΟ**

---

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμματικά* )

Εμβολιασμός με μεικτό διάλυμα αφλατοξινών μετά από δύο μήνες

Επιμόλυνση στείρου δείγματος καρυδόπιχας με 210 μl προτύπου δ/τος αφλατοξινών ΑΡΧ ΠΔΑ 20 02 Φ.508 ( B<sub>1</sub>: 3,13 ppb, B<sub>2</sub>: 3,38 ppb, G<sub>1</sub>: 3,02 ppb, G<sub>2</sub> 3,45 ppb.).

-Ζύγιση δείγματος. (50 gr πολτού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε δύο κωνικές φιάλες. ( $\delta = (\text{βάρους δείγματος}) / (\text{βάρους νερού}) 1/1.5$ ).

- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση στείρου δείγματος σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.
- re-165d.dat , s-212-2.dat ( πρότυπο).

-Εμβολιασμός

- re- 165f.dat (εκχύλιση με MeOH , V<sub>IAC</sub>= 4 ml + 46 mlH<sub>2</sub>O –δείγμα προς ανάλυση).
- re- 165g.dat (εκχύλιση με MeOH , V<sub>IAC</sub>= 4 ml + 46 mlH<sub>2</sub>O –δείγμα προς ανάλυση).
- s-301-2.dat ( πρότυπο).

Συνθήκες αποθήκευσης : Κατάψυξη στους -20<sup>0</sup>C

**ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ , ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ,  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

Είδος δείγματος :	Ρύζι
Χώρα προέλευσης :	Ταυλάνδη
Αρ.δείγ.Γ.Χ.Κ.	020/020/326/2005

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

- Άλεση δείγματος ρυζιού ( $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού}) 1/1$ ).
- Ζύγιση δείγματος ( περίπου 70gr πολτού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε τρεις κωνικές φιάλες.
- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.

---

Αποτελέσματα : **ΚΑΝΟΝΙΚΟ**

---

*Παρατηρήσεις:* Η Β1, Β2, G1 και G2 δεν εντοπίστηκαν, το εμβαδό κορυφής τους ήταν μηδενικό.

**ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ , ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ,  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

Είδος δείγματος : Αραβόσιτος

Χώρα προέλευσης : Αργεντινή

Αρ.δείγ.Γ.Χ.Κ. 020/020/322/2005

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμιακά* )

-Άλεση δείγματος αραβόσιτου ( $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού}) 1/1$ ).

-Ζύγιση δείγματος ( περίπου 70gr πολτού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε τρεις κωνικές φιάλες.

-Εκχύλιση με MeOH .

-Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.

---

Αποτελέσματα : **ΚΑΝΟΝΙΚΟ**

---

*Παρατηρήσεις:* Η Β1, Β2, G1 και G2 δεν εντοπίστηκαν, το εμβαδό κορυφής τους ήταν μηδενικό.

**ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ , ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ,  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

Είδος δείγματος:	Αραβόσιτος
Χώρα προέλευσης:	Η.Π.Α
Αριθμός δείγματος Γ.Χ.Κ.:	020/020/226/2005

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

- Άλεση δείγματος αραβόσιτου ( $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού}) 1/1.5$ ).
- Ζύγιση δείγματος ( περίπου 70gr πολλού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε τρεις κωνικές φιάλες.
- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.

---

Αποτελέσματα : **ΚΑΝΟΝΙΚΟ**

---

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

Δείγμα αραβόσιτου επιμολυσμένου με 1ml πρότυπον δ/τος αφλατοξινών APX ΠΔΑ 20 02 Φ.497(4\*100 ng/ml)

- Επιμόλυνση στείρου δείγματος αραβόσιτου με 1000 μl προτύπου δ/τος αφλατοξινών APX ΠΔΑ 20 02 Φ.497 (επίπεδο επιμόλυνσης 2ppb).
- Ζύγιση δείγματος. (50 gr πολλού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε δύο κωνικές φιάλες. ( $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού}) 1/1$ ).
  - Εκχύλιση με MeOH .
  - Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.
    - a) qc-226c.dat
    - b) qc-226d.dat
    - c) S-176-2.dat ( πρότυπο)



**ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ , ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ,  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

Είδος δείγματος :	Πιστάκια
Χώρα προέλευσης :	Η.Π.Α
Αρ.δείγ.Γ.Χ.Κ. 020/020/288/2005	

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

- Άλεση δείγματος φυστικίων κελυφωτών ( $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού}) 1/1.5$ ).
- Ζύγιση δείγματος ( περίπου 70gr πολτού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ) σε τρεις κωνικές φιάλες.
- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.

---

Αποτελέσματα : **ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ** ως προς το Γ επιμέρους δείγμα .

---

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

- Πήραμε από το Γ επιμέρους δείγμα τρία υποδείγματα Γ1,Γ2 και Γ3.
- Ζυγίσαμε μια ποσότητα πολτού του δείγματος ( περίπου 50,10 gr),σε τρεις κωνικές φιάλες των 100ml.
- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.

---

*Παρατηρήσεις:* Βρέθηκε μετά από υπολογισμούς η συγκέντρωση της Β1 και Β2 σε περιεκτικότητα 20,8 ng/kg και 1,6 ng/kg αντίστοιχα.

Η G1 και η G2 δεν εντοπίστηκαν, το εμβαδό κορυφής τους ήταν μηδενικό.

Η περιεκτικότητα του δείγματος ως προς τη Β1 ήταν αρκετά υψηλή.

Ο περιοριστικός παράγοντας για τα κελυφωτά φυστικάκια είναι 10 ng/kg, και ως προς την Β1 5 ng/kg, βάσει του Καν.257/2002/ΕΚ

---

**ΦΥΛΛΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΖΥΓΙΣΕΩΝ , ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ, ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ,  
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

Είδος δείγματος:	Αραχίδα
Χώρα προέλευσης:	Κίνα
Αριθμός δείγματος Γ.Χ.Κ.:	020/020/181/2005/Γ

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

- Άλεση δείγματος αραχίδας ( $\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού}) 1/1.5$ ).
- Ζύγιση δείγματος ( περίπου 70gr πολλού του δείγματος από τα επιμέρους δείγματα Α ,Β και Γ ) σε τρεις κωνικές φιάλες.
- Εκχύλιση με MeOH .
- Ανάλυση σύμφωνα με τη μέθοδο 20 02 ΑΦΛ 04.

---

Αποτελέσματα : **ΜΗ ΚΑΝΟΝΙΚΟ**

---

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

Πειραματισμοί – δοκιμές με διάφορους διαλύτες εκχύλισης στο Γ επιμέρους δείγμα αραχίδας.

1) Εκχύλιση με εξάνιο

- Ζύγιση δείγματος. (50,03 gr πολλού από το επιμέρους δείγμα Γ) σε μία κωνική φιάλη.
- Προσθήκη NaCl ( 5.03 gr).
- Εκχύλιση με Εξάνιο (100 ml) και MeOH (160 ml).
- Προσθήκη H<sub>2</sub>O ( 10 ml).
- Διήθηση για 30 min
- V<sub>IAC</sub>( 10 ml).

---

*Παρατηρήσεις:* Το δείγμα διαχωρίστηκε σε δύο φάσεις.

- α) Στοιβάδα εξανίου af-181cd.dat
  - β) Στοιβάδα MeOH και H<sub>2</sub>O af-181cc.dat
- 

Εργαστηριακά δεδομένα μεθόδου ( *Τίτλος ή κωδικός μεθόδου επιγραμμатικά* )

Σε ένα ποτήρι ζέσεως με 60 ml PBS ( Phosphate Buffer Saline Ph =7,4) προσθέσαμε 10 ml εκχύλισμα από τη φάση εξανίου, V<sub>IAC</sub> ( 10 ml).

Σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως με 60 ml PBS ( Phosphate Buffer Saline Ph =7,4) προσθέσαμε 10 ml εκχύλισμα από τη φάση MeOH - H<sub>2</sub>O, V<sub>IAC</sub> ( 10 ml).

---

*Παρατηρήσεις:*

- Το εκχύλισμα από τη φάση εξανίου (af-181cd.dat) ήταν θολό.
  - Το εκχύλισμα από τη φάση MeOH και H<sub>2</sub>O af-181cc.dat ήταν διαυγές.
- 

2) Εκχύλιση με χλωροφόρμιο και NaCl

-Ζύγιση δείγματος. (50,04 gr πολτού από το επιμέρους δείγμα Γ) σε μία κωνική φιάλη.

-Προσθήκη NaCl ( 5.0 gr).

-Εκχύλιση με χλωροφόρμιο (100 ml)

-Διήθηση για 30 min με φυγοκέντρηση ( evaporator)

-V<sub>IAC</sub> ( 5 ml).

---

*Παρατηρήσεις:*

- Το εκχύλισμα από τη φάση χλωροφορμίου (af-181ca.dat) αργούσε να διηθηθεί γι' αυτό το λόγο πήραμε μόνο 5 ml εκχυλίσματος και προσθέσαμε 4,5 ml MeOH και 4,5 ml H<sub>2</sub>O, V<sub>IAC</sub> ( 5 ml).
- 

3) Εκχύλιση με Χλωροφόρμιο και Γη διατόμων

- Ζύγιση δείγματος. (50,04 gr πολτού από το επιμέρους δείγμα Γ) σε μία κωνική φιάλη.

-Προσθήκη γης διατόμων ( 20 gr).

-Εκχύλιση με χλωροφόρμιο (250 ml)

-Διήθηση για 30 min με φυγοκέντρηση ( evaporator)

-V<sub>IAC</sub> ( 10 ml).

---

*Παρατηρήσεις:*

- Το εκχύλισμα από τη φάση χλωροφορμίου (af-181cb.dat) δεν μας δυσκόλεψε στη διήθηση ,έτσι πήραμε 10 ml εκχυλίσματος και προσθέσαμε 5 ml MeOH και 4,5 ml H<sub>2</sub>O, V<sub>IAC</sub> ( 10 ml).
-

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

# ΦΥΛΛΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ, ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/ΗPLC/PCD/FD

## ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/ΗPLC/PCD/FD

δος δείγματος :Καρύδια
ώρα προέλευσης : Ινδία
ελωνειακό: δείγμα από 20,2
ριθμός δείγματος ΓΧΚ : 020/020/165/2005

			Επιμέρους δείγματα		
			A	B	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	10320,2	10170,8	10050,1
	Βάρος νερού	gr	15510,0	15230,0	15107,0
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0.665	0.668	0.665
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,00	100,00	100,00
ΕΚΚΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	70.02	70.00	70.03
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	2,80	2,80	2,80
	+ MeOH pa (V)	ml	70,00	70,00	70,00
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( $V_{IAC}$ )	ml	4,00	4,00	4,00
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΚΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( $V_M$ )	ml	4,00	4,00	4,00
	Νερό ( $V_N$ )	ml	42,00	42,00	42,00
	$V_{IAC} + V_M + V_N$	ml	50,00	50,00	50,00
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00	2,00	2,00
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00	2,00	2,00
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( $V_{LC}$ )	ml	4,00	4,00	4,00
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( $f_{dil}$ )		1,00	1,00	1,00
	Z	ml/gr			

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Γραμμάτιο δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Αραίωσης $f_{dil}$	$= Z \cdot (100/rec) \cdot$	$= C \cdot (rec/100) \cdot$	
									$(A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$(V_{LC} / Z)$	
Α	B1	100.00	s-163-3.dat	2,00	16948	8474	af-165a.dat	0		0	0
	B2	100.00	"	2,00	17635	8818	"	0		0	0
	G1	100.00	"	2,00	97459	48730	"	0		0	0
	G2	100.00	"	2,00	14355	7178	"	0		0	0
<b>Σύνολο :</b>									0	0	
Β	B1	100.00	s-163-3.dat	2,00	16947	8474	af-165b.dat	0		0	0
	B2	100.00	"	2,00	17635	8818	"	0		0	0
	G1	100.00	"	2,00	97459	48730	"	0		0	0
	G2	100.00	"	2,00	14355	7178	"	0		0	0
<b>Σύνολο :</b>									0	0	
Γ	B1	100.00	s-163-3.dat	2,00	16947	8474	af-165c.dat	0		0	0
	B2	100.00	"	2,00	17635	8818	"	0		0	0
	G1	100.00	"	2,00	97459	48730	"	0		0	0
	G2	100.00	"	2,00	14355	7178	"	0		0	0
<b>Σύνολο :</b>									0	0	

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/HPLC/PCD/FD**

Είδος δείγματος : Δείγμα καρυδόφυγας επιμολυσμένο με 210μl πρότυπου δ/τος αφλατοξινών ΑΡΧ ΠΔΑ 20 02Φ.508
Χώρα προέλευσης : Ινδία
Δειγματοληψία από: 20,2 tn
Αριθμός δείγματος ΓΧΚ : 020/020/165/2005

			Επιμέρους δείγματα		
			Α	Β	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	50,0	50,0	
	Βάρος νερού	gr	75,0	75,0	
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,667	0,667	
	Ολικό βάρος περίπου 100 ατέριων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,00	100,00	
ΕΚΧΥΔΕΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	125,0	125,0	
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	5,00	5,00	
	+ MeOH pa (V)	ml	125,00	125,00	
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( $V_{IAC}$ )	ml	4,00	4,00	
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( $V_M$ )	ml	0,00	0,00	
	Νερό ( $V_N$ )	ml	46,00	46,00	
	$V_{IAC} + V_M + V_N$	ml	50,00	50,00	
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00	2,00	
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00	2,00	
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( $V_{LC}$ )	ml	4,00	4,00	
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραίωσης ( $f_{dil}$ )		1,00	1,00	
	Z	ml/gr	4,0000	4,0000	

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot \{ (V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta) \} \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής αραίωσης $f_{dil}$	C (μg/Kg)	ng στην IAC	
									= $Z \cdot (100/rec) \cdot (A_x / RF) \cdot f_{dil}$	= $C \cdot (rec/100) \cdot (V_{LC} / Z)$	
A	B1	100,0	s-301-2.dat	1,86	16896	9084	re-165f.dat	5248	1,00	2.3	2.3
	B2	100,0	"	2,01	19534	9718	"	6207	1,00	2.6	2.6
	G1	100,0	"	1,80	11359	6311	"	3978	1,00	2.5	2.5
	G2	100,0	"	2,05	15183	7406	"	3699	1,00	2.0	2.0
<b>Σύνολο :</b>									<b>9.4</b>	<b>9.4</b>	
B	B1	100,0	s-301-2.dat	1,86	16896	9084	re-165g.dat	5078	1,00	2.2	2.2
	B2	100,0	"	2,01	19534	9718	"	5822	1,00	2.4	2.4
	G1	100,0	"	1,80	11359	6311	"	3793	1,00	2.4	2.4
	G2	100,0	"	2,05	15183	7406	"	3454	1,00	1.9	1.9
<b>Σύνολο :</b>									<b>8.9</b>	<b>8.9</b>	
Γ	B1						3,13	2.3	2.2	73.83	71.5
	B2						3,38	2.6	2.4	75.58	70.9
	G1						3,02	2.5	2.4	83.49	79.6
	G2						3,45	2.0	1.9	57.91	54.1
<b>Σύνολο :</b>											



**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/HPLC/PCD/FD**

Είδος δείγματος: Ρύζι
ώρα προέλευσης: Ταϊλάνδη
γορανομικό
ρ.δείγμ.Γ.Χ.Κ. 020/020/326/2005

			Επιμέρους δείγματα		
			Α	Β	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	4890.1		
	Βάρος νερού	gr	4895,0		
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		1,000		
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	70.00		
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	2,80		
	MeOH ρα ( V )	ml	70.00		
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( V <sub>IAC</sub> )	ml	4,00		
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH ρα ( V <sub>M</sub> )	ml	4,00		
	Νερό ( V <sub>N</sub> )	ml	42,00		
	V <sub>IAC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	50,00		
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00		
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00		
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( V <sub>LC</sub> )	ml	4,00		
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραίωσης ( f <sub>dil</sub> )		1,00		
	Z	ml/gr			

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot \{ (V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta) \} \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη		% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαθον κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαθον κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής αραίωσης $f_{dil}$	$= Z \cdot (100/rec) \cdot$ $(A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$= C \cdot (rec/100) \cdot$ $(V_{LC} / Z)$
Α	B1		af-326.dat	2,00	20388	10194	ht-09.dat	0	1,00	0,0	0,0
	B2		"	2,00	19868	9934	"	0	1,00	0,0	0,0
	G1		"	2,00	12393	6196,5	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2		"	2,00	14260	7130	"	0	1,00	0,0	0,0
Σύνολο :										0,0	0,0
Β	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
Σύνολο :											
Γ	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
Σύνολο :											

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/HPLC/PCD/FD**

Ιδός δείγματος :	Καλαμπόκι
Ώρα προεύλευσης :	Αργεντινή
ελωνειακό :	δείγμα από 23,5 tn
ριθμός δείγματος ΓΧΚ :	020/020/322/2005

			Επιμέρους δείγματα		
			Α	Β	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	10180,2	10035,1	10050,0
	Βάρος νερού	gr	10.192	10035,0	10069,0
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0.998	1.00	0.998
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0	100,0	100,0
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	70,00	70,05	70,00
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	2,80	2,80	2,80
	MeOH pa ( V )	ml	70	70	70
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( V <sub>IAC</sub> )	ml	3	3	3
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( V <sub>M</sub> )	ml	4	4	4
	Νερό ( V <sub>N</sub> )	ml	43	43	43
	V <sub>IAC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	50.0	50.0	50.0
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2	2	2
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2	2	2
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( V <sub>LC</sub> )	ml	4	4	4
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( f <sub>dil</sub> )		1	1	1
Z	ml/gr				

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [ (V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta) ] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη		% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής αραίωσης $f_{dil}$	$= Z \cdot (100/rec) \cdot$ $(A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$= C \cdot (rec/100) \cdot$ $(V_{LC} / Z)$
Α	B1		s-322-1.dat	2,00	17343	8671	af-322a.dat	0		0,0	0,0
	B2		"	2,00	17300	8650	"	0		0,0	0,0
	G1		"	2,00	10488	5244	"	0		0,0	0,0
	G2		"	2,00	12897	6449	"	0		0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
Β	B1		s-322-1.dat	2,00	17343	8671	af-322.dat	0		0,0	0,0
	B2		"	2,00	17300	8650	"	0		0,0	0,0
	G1		"	2,00	10488	5244	"	0		0,0	0,0
	G2		"	2,00	12897	6449	"	0		0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
Γ	B1		s-322-1.dat	2,00	17343	8671	af-322c.dat	0		0,0	0,0
	B2		"	2,00	17300	8650	"	0		0,0	0,0
	G1		"	2,00	10488	5244	"	0		0,0	0,0
	G2		"	2,00	12897	6449	"	0		0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/ΗPLC/PCD/FD**

Δείγμα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας της μεθόδου 20 02 ΑΦΑ 04

Όδος δείγματος: Δείγμα αραβοσίτου επιμολυσμένο με 1ml πρότυπου διαλύματος αφλατοξινών ( 4x100 ng/ml ),  
πρότυπο επιμόλυνσης 2ppb.

Όδος προέλευσης Η.Π.Α

Αριθμός δείγματος ΓΧΚ : 020/020/226/2005

			Επιμέρους δείγματα		
			A	B	Γ
ΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	50.1	50.1	
	Βάρος νερού	gr	50.1	50.1	
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		1,000	1,000	
ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100.00	100.00	
ΕΚΧΥΛΙΣΗ	Βάρος πολτού ( m )	gr	100.00	100.00	
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	4.00	4.00	
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	MeOH pa ( V )	ml	0.00	0.00	
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( V <sub>ΙΑC</sub> )	ml	10.00	10.00	
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( V <sub>M</sub> )	ml	0.00	0.00	
	Νερό ( V <sub>N</sub> )	ml	40.00	40.00	
ΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	V <sub>ΙΑC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	50.00	50.00	
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2.00	2.00	
	Προσθήκη νερού	ml	2.00	2.00	
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( V <sub>LC</sub> )	ml	4.00	4.00	
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( f <sub>αι</sub> )		1.00	1.00	
Z	ml/gr	1.2	1.2		

$$\text{όπου : } Z = (V_{LC} / V_{IAc}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$$

$$\text{και } d_N = 1 \text{ gr/ml}$$

Αφλατοξίνη		% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Ζυγκέντρωση προτύπου C <sub>std</sub> (ng/ml)	Εμβαθύνση κορυφής A <sub>std</sub> (x 10 <sup>3</sup> )	Ζώνη αποκρίσεως RF=A <sub>std</sub> /C <sub>std</sub>	Filename δείγματος	Εμβαθύνση κορυφής A <sub>x</sub> (x 10 <sup>3</sup> )	Αραίωση f <sub>dil</sub>	= Z . (100/rec) . (A <sub>x</sub> / RF) . f <sub>dil</sub>	= C . (rec/100) . (V <sub>LC</sub> / Z)
A	B1	100.00	s-176-2.dat	2.00	18260	9130	qc-226c.dat	8329	1.00	1.1	3.6
	B2	100.00	"	2.00	18846	9423	"	7992	1.00	1.0	3.4
	G1	100.00	"	2.00	10548	5274	"	5487	1.00	1.2	4.2
	G2	100.00	"	2.00	16106	8053	"	4381	1.00	0.7	2.2
<b>Σύνολο :</b>										<b>4.0</b>	<b>13.4</b>
B	B1	100.00	s-176-2.dat	2.00	18260	9130	qc-226d.dat	7747	1.00	1.0	3.4
	B2	100.00	"	2.00	18846	9423	"	8602	1.00	1.1	3.7
	G1	100.00	"	2.00	10548	5274	"	5289	1.00	1.2	4.0
	G2	100.00	"	2.00	16106	8053	"	4443	1.00	0.7	2.2
<b>Σύνολο :</b>										<b>4.0</b>	<b>13.3</b>
Γ	B1	100.00					2.00	1.1	1.0	54.74	50.9
	B2	100.00					2.00	1.0	1.1	50.89	54.8
	G1	100.00					2.00	1.2	1.2	62.42	60.2
	G2	100.00					2.00	0.7	0.7	32.64	33.1
<b>Σύνολο :</b>											

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/ΗPLC/PCD/FD**

Είδος δείγματος:	Πιστάκια
Χώρα προέλευσης:	Η.Π.Α
Γεωγραφικό:	δείγμα από 20,5 tn
Αρ. δείγμ. Γ.Χ.Κ.	020/020/288/2005/Γ

			Επιμέρους δείγματα		
			Γ1	Γ2	Γ3
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	9300,9	9300,9	9300,9
	Βάρος νερού	gr	13951,3	13951,3	13951,3
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,667	0,667	0,667
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr	131.5	131.5	131.5
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr	71.5	71.5	71.5
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		54.4%	54.4%	54.4%
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	50,10	50,10	50,10
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	2,04	2,01	2,02
	MeOH pa ( V )	ml	50,00	50,00	50,00
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( V <sub>ΙΑC</sub> )	ml	4,00	4,00	4,00
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( V <sub>M</sub> )	ml	4,00	4,00	4,00
	Νερό ( V <sub>N</sub> )	ml	42,00	42,00	42,00
	V <sub>ΙΑC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	50,00	50,00	50,00
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00	2,00	2,00
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00	2,00	2,00
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( V <sub>LC</sub> )	ml	4,00	4,00	4,00
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( f <sub>dil</sub> )		1,00	1,00	1,00
	Z	ml/gr	7,3437	7,3437	7,3456

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Διπλασιασμός αραίωσης $f_{dil}$	Συντελεστής ανάκτησης		
									$= Z \cdot (100/rec) \cdot (A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$= C \cdot (rec/100) \cdot (V_{LC} / Z)$	
Α	B1	100,0	s-291-1.dat	1,86	17056	9170	af288c1.dat	25635	1,00	20,5	0,4
	B2	100,0	"	2,01	18967	9436	"	1938	1,00	1,5	0,8
	G1	100,0	"	1,80	11527	6404	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	100,0	"	2,05	14992	7313	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										<b>22,0</b>	<b>12,0</b>
Β	B1	100,0	s-291-1.dat	1,86	17056	9170	af288c2.dat	24814	1,00	19,9	10,8
	B2	100,0	"	2,01	18967	9436	"	2002	1,00	1,6	0,8
	G1	100,0	"	1,80	11527	6404	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	100,0	"	2,05	14992	7313	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										<b>21,4</b>	<b>11,7</b>
Γ	B1	100,0	s-291-1.dat	1,86	17056	9170	af288c3.dat	27386	1,00	21,9	11,9
	B2	100,0	"	2,01	18967	9436	"	2113	1,00	1,6	0,9
	G1	100,0	"	1,80	11527	6404	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	100,0	"	2,05	14992	7313	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										<b>23,6</b>	<b>12,8</b>



**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/HPLC/PCD/FD**

Όδος δείγματος : Αραχίδες
Ρα προέλευσης Κίνα
Γελωνειακό: δείγμα από 18,5 tn
Θμός δείγματος Ι ΧΚ : 020/020/181/2005

			Επιμέρους δείγματα		
			Α	Β	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	9800,1	9790,4	10120,8
	Βάρος νερού	gr	14672,0	14702,0	15163,0
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,668	0,666	0,667
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0	100,0	100,0
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	70,09	70,03	70,10
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	2,80	2,80	2,80
	+ MeOH ρα ( V )	ml	70,00	70,00	70,00
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( V <sub>IAC</sub> )	ml	4,00	4,00	4,00
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH ρα ( V <sub>M</sub> )	ml	4,00	4,00	4,00
	Νερό ( V <sub>N</sub> )	ml	42,00	42,00	42,00
	V <sub>IAC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	50,00	50,00	50,00
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00	2,00	2,00
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00	2,00	2,00
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( V <sub>LC</sub> )	ml	4,00	4,00	4,00
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( f <sub>dil</sub> )		1,00	1,00	1,00
	Z	ml/gr	3,9910	4,0023	3,9928

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής αραίωσης $f_{dil}$	$= Z \cdot (100/rec) \cdot$	$= C \cdot (rec/100) \cdot$	
									$(A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$(V_{LC} / Z)$	
Α	B1	100,0	s-181-1.dat	2,00	17226	8613	af-181a.dat	675	1,00	0,3	0,3
	B2	100,0	"	2,00	19027	9514	"	0	1,00	0,0	0,0
	G1	100,0	"	2,00	10356	5178	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	100,0	"	2,00	15945	7973	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										0,3	0,3
Β	B1	100,0	s-181-1.dat	2,00	14838	7419	af-181b.dat	8679	1,00	4,7	4,7
	B2	100,0	"	2,00	19186	9593	"	1073	1,00	0,4	0,4
	G1	100,0	"	2,00	9091	4546	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	100,0	"	2,00	11488	5744	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										5,1	5,1
Γ	B1	100,0	s-181-1.dat	2,00	14838	7419	af-181c.dat	20667	1,00	11,1	11,1
	B2	100,0	"	2,00	19186	9593	"	4401	1,00	1,8	1,8
	G1	100,0	"	2,00	9091	4546	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	100,0	"	2,00	11488	5744	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>										13,0	13,0

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/HPLC/PCD/FD**

ος δείγματος : Αραχίδες χωρίς κέλυφος

ρα προέλευσης: Κίνα

θμός δείγματος ΓΧΚ : 020/020/181/2005/Γ

εκχύλιση με χλωροφόρμιο

Επιμέρους δείγματα

			A	B	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	10120,8		
	Βάρος νερού	gr	15163,0		
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,667		
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	50,04		
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	5,00		
	+ Χλωροφόρμιο (V)	ml	100,00		
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( $V_{IAC}$ )	ml	5,00		
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( $V_M$ )	ml	5,00		
	Νερό ( $V_N$ )	ml	4,50		
	$V_{IAC} + V_M + V_N$	ml	14,50		
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00		
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00		
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( $V_{LC}$ )	ml	4,00		
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( $f_{dil}$ )		1,00		
	Z	ml/gr	5,1925		

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής αραίωσης $f_{dil}$	$= Z \cdot (100/rec) \cdot$	$= C \cdot (rec/100) \cdot$	
									$(A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$(V_{LC} / Z)$	
Α	B1	75,8	s-181-3.dat	2,00	17188	8594	af-181ca.dat	8534	1,00	6,8	4,0
	B2	87,1	"	2,00	18810	9405	"	1832	1,00	1,2	0,8
	G1	83,4	"	2,00	10086	5043	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	78,2	"	2,00	15335	7668	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>									8,0	4,8	
Β	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
<b>Σύνολο :</b>											
Γ	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
<b>Σύνολο :</b>											

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/HPLC/PCD/FD**

ος δείγματος : Αραχίδες χωρίς κελυφός
α προέλευσης: Κίνα
θμός δείγματος ΓΧΚ : 020/020/181/2005/Γ

prep BX 620/50

εκχύλιση με χλωροφόρμιο & γη διατόμων

			Επιμέρους δείγματα		
			Α	Β	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	10120,8		
	Βάρος νερού	gr	15163,0		
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,667		
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	50,03		
	Γη διατόμων	gr	20,00		
	MeOH pa ( V ) ( Χλωροφόρμιο )	ml	250,00		
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη ( V <sub>ΙΑC</sub> )	ml	10,00		
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa ( V <sub>M</sub> )	ml	5,00		
	Νερό ( V <sub>N</sub> )	ml	4,50		
	V <sub>ΙΑC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	19,50		
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00		
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00		
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC ( V <sub>LC</sub> )	ml	4,00		
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης ( f <sub>αι</sub> )		1,00		
	Z	ml/gr	5,5927		

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{ΙΑC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη		% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου C <sub>std</sub> (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής A <sub>std</sub> (x 10 <sup>3</sup> )	Συντελεστής απόκρισης RF=A <sub>std</sub> /C <sub>std</sub>	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής A <sub>x</sub> (x 10 <sup>3</sup> )	Συντελεστής αραίωσης f <sub>dil</sub>	= Z . (100/rec) . (A <sub>x</sub> / RF) . f <sub>dil</sub>	= C . (rec/100) . (V <sub>LC</sub> / Z)
A	B1	75,8	s-181-3.dat	2,00	17188	8594	af-181cb.dat	11299	1,00	9,7	5,3
	B2	87,1	"	2,00	18810	9405	"	2364	1,00	1,6	1,0
	G1	83,4	"	2,00	10086	5043	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	78,2	"	2,00	15335	7668	"	0	1,00	0,0	0,0
Σύνολο :										11,3	6,3
B	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
Σύνολο :											
Γ	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
Σύνολο :											

**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/ΗPLC/PCD/FD**

ς δείγματος : Αραχίδες χωρίς κέλυφος

α προέλευσης: Κίνα

ημος δείγματος ΓΧΚ : 020/020/181/2005/Γ

Εκχύλιση με εξάνιο (στοιβάδα MeOH-H <sub>2</sub> O)			Επιμέρους δείγματα		
			A	B	F
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	10120,8		
	Βάρος νερού	gr	15163,0		
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,667		
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	50,03		
	+ NaCl (0.04 · m)	gr	5,03		
	+ MeOH pa (V) + νερό + εξάνιο	ml	270,00		
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη (V <sub>IAC</sub> )	ml	10,00		
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa (VM)	ml	0,00		
	PBS	ml	60,00		
	V <sub>IAC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	70,00		
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00		
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00		
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC (V <sub>LC</sub> )	ml	4,00		
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης (f <sub>dil</sub> )		1,00		
	Z	ml/gr	5,9922		

όπου :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου $C_{std}$ (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής $A_{std}$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής απόκρισης $RF=A_{std}/C_{std}$	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής $A_x$ ( $\times 10^3$ )	Συντελεστής αραίωσης $f_{dil}$	$= Z \cdot (100/rec) \cdot$	$= C \cdot (rec/100) \cdot$	
									$(A_x / RF) \cdot f_{dil}$	$(V_{LC} / Z)$	
Α	B1	75,8	s-181-3.dat	2,00	17188	8594	af-181cc.dat	23128	1,00	21,3	10,8
	B2	87,1	"	2,00	18810	9405	"	4302	1,00	3,1	1,8
	G1	83,4	"	2,00	10086	5043	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	78,2	"	2,00	15335	7668	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>									24,4	12,6	
Β	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
<b>Σύνολο :</b>											
Γ	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
<b>Σύνολο :</b>											



**ΦΥΛΛΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΙΑC/ΗPLC/ΡCD/FD**

δος δειγματος : Αραχίδες
ρα προέλευσης Κίνα
Γελωνειακό: δείγμα από 18,5 tn
Θμός δειγματος Ι ΧΚ : 020/020/181/2005

prep ΒΧ 620/50

εξάνιο (στοιβάδα εξανίου)

			Επιμέρους δείγματα		
			Α	Β	Γ
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Βάρος δείγματος	gr	10120,8		
	Βάρος νερού	gr	15163,0		
	$\delta = (\text{βάρος δείγματος}) / (\text{βάρος νερού})$		0,667		
	Ολικό βάρος περίπου 100 ακέραιων καρπών	gr			
	Βάρος βρώσιμου μέρους των ανωτέρω καρπών	gr			
	$\beta = 100 \cdot (\text{βάρος βρώσιμου μέρους}) / (\text{ολικό βάρος})$		100,0		
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ	Βάρος πολτού (m)	gr	50,03		
	+ NaCl (0.04 . m)	gr	5,03		
	+ MeOH pa (V) + νερό + εξάνιο	ml	270,00		
	Εκχύλισμα για ανοσοχημική στήλη (V <sub>IAC</sub> )	ml	10,00		
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	Πρόσθετη MeOH pa (VM)	ml	0,00		
	PBS	ml	60,00		
	V <sub>IAC</sub> + V <sub>M</sub> + V <sub>N</sub>	ml	70,00		
	Παραλαβή αφλατοξινών με MeOH HPLC	ml	2,00		
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Προσθήκη νερού	ml	2,00		
	Όγκος διαλύματος για ένεση HPLC (V <sub>LC</sub> )	ml	4,00		
	Αραιώσεις με MeOH/H <sub>2</sub> O (1+1) :				
	Συντελεστής αραιώσης (f <sub>m</sub> )		1,00		
	Z	ml/gr	5,9922		

που :  $Z = (V_{LC} / V_{IAC}) \cdot [(V/m) \cdot (1 + (1/\delta)) + (1/d_N) \cdot (1/\delta)] \cdot (100/\beta)$

και  $d_N = 1 \text{ gr/ml}$

Αφλατοξίνη	% ανάκτηση (rec)	Filename προτύπου	Συγκέντρωση προτύπου C <sub>std</sub> (ng/ml)	Εμβαδόν κορυφής A <sub>std</sub> (x 10 <sup>3</sup> )	Συντελεστής απόκρισης RF=A <sub>std</sub> /C <sub>std</sub>	Filename δείγματος	Εμβαδόν κορυφής A <sub>x</sub> (x 10 <sup>3</sup> )	Συντελεστής αραιώσης f <sub>dil</sub>	= Z . (100/rec) .	= C . (rec/100) .	
									(A <sub>x</sub> / RF) . f <sub>dil</sub>	( V <sub>LC</sub> / Z )	
Α	B1	75,8	s-181-4.dat	2,00	16670	8335	af-181cd.dat	0	1,00	0,0	0,0
	B2	87,1	"	2,00	18490	9245	"	0	1,00	0,0	0,0
	G1	83,4	"	2,00	9568	4784	"	0	1,00	0,0	0,0
	G2	78,2	"	2,00	14894	7447	"	0	1,00	0,0	0,0
<b>Σύνολο :</b>									0,0	0,0	
Β	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
<b>Σύνολο :</b>											
Γ	B1										
	B2										
	G1										
	G2										
<b>Σύνολο :</b>											

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ**  
**ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΟΔΗΓΙΑΣ 98/53 Ε.Ε.**

Σήμερα ...../...../200.... , οι παρακάτω υπογεγραμμένοι :

1. .... υπάλληλος της Α' Χ.Υ. Πειραιά του ΓΧΚ .
2. .... υπάλληλος της Δ/σης Εργαστηριακών Ελέγχων του Ε.Φ.Ε.Τ. .
3. .... εκπρόσωπος της επιχείρησης από την οποία έγινε η δειγματοληψία .

στους εργαστηριακούς χώρους της Α' Χ.Υ. Πειραιά, αποσφραγίσαμε δείγμα .....(βάρους .....Kg) , το οποίο είχε προσκομιστεί εις απλούν στην Α' Χ.Υ. Πειραιά από την Δ/ση Εργαστηριακών Ελέγχων του Ε.Φ.Ε.Τ. με το αρ. πρωτ. .... έγγραφο (αριθμός δείγματος Ε.Φ.Ε.Τ. ....)

Το δείγμα αλέστηκε και ομογενοποιήθηκε μαζί με νερό στη συσκευή SILVERSON (20 ΟΜΓ 05) σε αναλογία βάρος νερού προς βάρος καρπών ίση με 1,50 . Από τον προκύψαντα πολτό του δείγματος ελήφθησαν δείγματα πρώτης (Α') και κατ' έφεση (Β') εξέτασης αφλατοξινών , τα οποία , αφού επισημάνθησαν , υπεγράφησαν και εσφραγίσθησαν δεόντως από τους ανωτέρω , τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη ...../ράφι ..... της Α' Χ.Υ. Πειραιά .

Ποσοστό βάρους του βρώσιμου μέρους του δείγματος : .....

[Πρίν από την άλεση και ομογενοποίηση με νερό , ζυγίστηκαν ..... (περίπου 100) ολόκληροι καρποί , ληφθέντες ισάριθμοι και από τα τρία επιμέρους δείγματα :  $M = \dots \text{ gr}$  . Αποχωρίστηκε το βρώσιμο μέρος αυτών και ζυγίστηκε :  $M_{\beta} = \dots \text{ gr}$  . Ποσοστό βάρους βρώσιμου μέρους =  $100 \times (M_{\beta}/M)$  . ]

(Υπογραφές)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV

## Νομοθεσία σχετική με τις Μυκοτοξίνες

(ώστε να εξασφαλίζεται η προστασία των καταναλωτών).

Κανονισμός 466/2001/ΕΚ για τον καθορισμό μέγιστων τιμών ανοχής /(μg/Kg) –  
(μυκοτοξίνες, βαρέα μέταλλα, νιτρικά)

Κανονισμός 257/2002 /ΕΚ για την τροποποίηση του Κ. 194/97 και Κ.  
466/2001/ΕΚ .

	Μέγιστη τιμή ανοχής/(μg/Kg)			Νομοθεσία	
	B1	B1+B2+G1+G2	M1 (προϊόν μεταβολισμού της B1)	Μέθοδος Δειγματοληψίας	Αναλυτική μέθοδος
<b>Μπαχαρικά</b>	5	10	-	Οδηγία 98/53/ΕΚ	Οδηγία 98/53/ΕΚ
<b>Ξηροί καρποί -ΜΚ δείγματα</b>	2	4		Οδηγία 98/53/ΕΚ	Οδηγία 98/53/ΕΚ
<b>Περιοριστικοί όροι</b>	5	10		Οδηγία 98/53/ΕΚ	
- πλιτάκια	8	15		Οδηγία 98/53/ΕΚ	Οδηγία 98/53/ΕΚ
- αραχίδες				Κ. 257/2002 /ΕΚ	Οδηγία 98/53/ΕΚ
Σιτηρά	2	4		Οδηγία 98/53/ΕΚ Κ. 257/2002 /ΕΚ	Οδηγία 98/53/ΕΚ
Γάλα	-	-	0,05	Οδηγία 98/53/ΕΚ Κ. 466/01	Οδηγία 98/53/Ε

Κανονισμός 472/2002/ΕΚ καθορισμός μέγιστων τιμών ανοχής /(μg/Kg) –  
(για την Τροποποίηση του Κανονισμού 466/2001 και 257/2002)

ξ Υπουργική Απόφαση 91587/92 (ΦΕΚ 642/β'3-11-1992 για τον καθορισμό  
μέγιστων ανεκτών ορίων μυκοτοξινών σε γεωργικά προϊόντα)

Κανονισμός **315/1993 /ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 8-2-1993 (ΕΕ L 37/13-2-93) για την θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών για τις προσμίξεις στα τρόφιμα.

Κανονισμός **339/1993 /ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 8-2-1993 (ΕΕ L 40/93), για τους ελέγχους της πιστότητας, των προϊόντων που εισάγονται από τρίτες χώρες, προς τους κανόνες που ισχύουν για την ασφάλεια των προϊόντων.

Κανονισμός **1525/1998 /ΕΚ** για την τροποποίηση του Κ. 194/97(για τον καθορισμό μέγιστων ανοχής)

Απόφαση **517/2002** του Α.Χ.Σ. (ΦΕΚ 378/Β'/31-3-2003) για την τροποποίηση της Απόφασης 35/2001, σε εναρμόνιση προς την Οδηγία 2002/27/ΕΚ της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (ΕΕ L 75/16-3-2002), για την τροποποίηση της Οδηγίας 98/53/ΕΚ, για την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων για ορισμένες προσμίξεις στα τρόφιμα.

Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

► **B**

**ΟΔΗΓΙΑ 98/53/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

της 16ης Ιουλίου 1998

για την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των  
μέγιστων περιεκτικοτήτων για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(ΕΕ L 201 της 17.7.1998, σ. 93)

Τροποποιείται από:

Επίσημη Εφημερίδα  
αριθ. σελίδα ημερομηνία

► **M1** Οδηγία 2002/27/ΕΚ της Επιτροπής της 13ης Μαρτίου 2002

L 75 44 16.3.2002



▼B

## ΟΔΗΓΙΑ 98/53/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 16ης Ιουλίου 1998

για την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 85/591/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 1985 για την καθιέρωση κοινοτικών τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον έλεγχο των τροφίμων<sup>(1)</sup>, και ιδίως το άρθρο 1,

Εκτιμώντας:

ότι ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1525/98 της Επιτροπής, της 16ης Ιουλίου 1998, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 194/97 για τον καθορισμό μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα<sup>(2)</sup>, καθορίζει τις μέγιστες περιεκτικότητες για τις αφλατοξίνες σε ορισμένα τρόφιμα·

ότι η οδηγία του Συμβουλίου 93/99/ΕΟΚ, της 29ης Οκτωβρίου 1993, σχετικά με τα πρόσθετα μέτρα που αφορούν τον επίσημο έλεγχο των τροφίμων<sup>(3)</sup>, εισάγει ένα σύστημα κανόνων ποιότητας για τα εργαστήρια που είναι επιφορτισμένα από τα κράτη μέλη με τον επίσημο έλεγχο των τροφίμων·

ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αξιοπιστία του προσδιορισμού της περιεκτικότητας αφλατοξινών, που εμφανίζονται εν γένει με ιδιαίτερα ετερογενή τρόπο στις παρτίδες·

ότι είναι αναγκαίο να καθοριστούν τα γενικά κριτήρια, στα οποία πρέπει να ανταποκρίνονται οι μέθοδοι ανάλυσης, προκειμένου τα εργαστήρια τα οποία είναι επιφορτισμένα με τη διεξαγωγή των ελέγχων, να χρησιμοποιούν μεθόδους ανάλυσης συγκρίσιμου επιπέδου επιδόσεων·

ότι οι διατάξεις που αφορούν τον τρόπο δειγματοληψίας και τις μεθόδους ανάλυσης θεσπίζονται βάσει των παρουσών γνώσεων και ότι μπορούν να προσαρμοστούν στην εξέλιξη των επιστημονικών και τεχνικών γνώσεων·

ότι οι τρόποι δειγματοληψίας που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος από τις αρμόδιες αρχές στα κράτη μέλη διαφέρουν σημαντικά· ότι, σε ορισμένα κράτη μέλη οι αρμόδιες αρχές δεν είναι σε θέση να θέσουν βραχυπρόθεσμα σε εφαρμογή όλες τις διατάξεις της παρούσας οδηγίας· ότι είναι κατά συνέπεια αναγκαίο να προβλεφθεί μία κατάλληλη προθεσμία για να τεθούν σε εφαρμογή οι εν λόγω διατάξεις·

ότι τα κράτη μέλη θα πρέπει να τροποποιήσουν προοδευτικά τους τρόπους δειγματοληψίας τους, προκειμένου να τηρήσουν, άμα τη λήξει της προθεσμίας για τη θέση σε εφαρμογή, τις διατάξεις που προβλέπονται στα παραρτήματα της παρούσας οδηγίας· ότι για το σκοπό αυτό θα πρέπει να εξετασθεί κατά τακτά χρονικά διαστήματα με τα κράτη μέλη η θέση σε εφαρμογή των εν λόγω διατάξεων·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής τροφίμων,

<sup>(1)</sup> ΕΕ L 372 της 31. 12. 1985, σ. 50.

<sup>(2)</sup> Βλέπε σελίδα 43 της παρούσας Επίσημης Εφημερίδας.

<sup>(3)</sup> ΕΕ L 290 της 24. 11. 1993, σ. 14.

## ▼B

ΕΞΕΛΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

*Άρθρο 1*

Τα κράτη μέλη λαμβάνουν όλα τα αναγκαία μέτρα κατά τρόπο ώστε οι δειγματοληψίες για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων σε αφλατοξίνες των τροφίμων να πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο παράρτημα I της παρούσας οδηγίας.

*Άρθρο 2*

Τα κράτη μέλη λαμβάνουν όλα τα αναγκαία μέτρα κατά τρόπο ώστε η παρασκευή των δειγμάτων και η χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των μέγιστων περιεκτικοτήτων σε αφλατοξίνες στα τρόφιμα να ανταποκρίνονται στα κριτήρια που περιγράφονται στο παράρτημα II της παρούσας οδηγίας.

*Άρθρο 3*

Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ το αργότερο στις 31 Δεκεμβρίου 2000 τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι απαραίτητες για να συμμορφωθούν προς τις διατάξεις της παρούσας οδηγίας. Ενημερώνουν αμέσως σχετικά την Επιτροπή.

Όταν τα κράτη μέλη θεσπίζουν τις εν λόγω διατάξεις, αυτές περιέχουν αναφορά στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από σχετική αναφορά κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Οι λεπτομέρειες της εν λόγω αναφοράς θεσπίζονται από τα κράτη μέλη.

*Άρθρο 4*

Η παρούσα οδηγία τίθεται σε ισχύ την εικοστή ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

▼B

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

## Τρόποι δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των περιεκτικότητας σε αφλατοξίνες ορισμένων τροφίμων

## 1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Τα δείγματα που προορίζονται για τους επίσημους ελέγχους της περιεκτικότητας σε αφλατοξίνες επί και εντός των τροφίμων λαμβάνονται σύμφωνα με τις λεπτομέρειες που αναφέρονται κατωτέρω. Τα συνολικά δείγματα που λαμβάνονται κατ' αυτόν τον τρόπο θεωρούνται ως αντιπροσωπευτικά των παρτίδων. Η συμφωνία των παρτίδων, όσον αφορά τις μέγιστες περιεκτικότητες που καθορίζονται στον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1525/98 προσδιορίζεται σε συνάρτηση με τις περιεκτικότητες που διαπιστώνονται στα δείγματα εργαστηρίου.

## 2. Ορισμοί

<i>Παρτίδα:</i>	Αναγνωρίσιμη ποσότητα τροφίμου, η οποία παραδίδεται σε μία αποστολή και για την οποία διαπιστώνεται κατά τον επίσημο έλεγχο ότι παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά όπας καταγωγή, ποικιλία, τύπο συσκευασίας, συσκευαστή, αποστολέα ή σήμανση.
<i>Υποπαρτίδα:</i>	Συγκεκριμένο τμήμα μιας μεγάλης παρτίδας προκειμένου να εφαρμοστεί ο τρόπος δειγματοληψίας στο εν λόγω συγκεκριμένο μέρος. Κάθε υποπαρτίδα πρέπει να διαχωρίζεται φυσικά και να μπορεί να ταυτοποιηθεί.
<i>Στοιχειώδες δείγμα:</i>	Ποσότητα ύλης που λαμβάνεται σε ένα μόνο σημείο της παρτίδας ή της υποπαρτίδας.
<i>Συνολικό δείγμα:</i>	Άθροισμα όλων των στοιχειωδών δειγμάτων που λαμβάνονται επί της παρτίδας ή της υποπαρτίδας.
<i>Δείγμα εργαστηρίου:</i>	Δείγμα που προορίζεται για το εργαστήριο (επιμέρους δείγμα).

## 3. Γενικές διατάξεις

## 3.1. Προσωπικό

Η δειγματοληψία πρέπει να πραγματοποιείται από επιφορτισμένο για το σκοπό αυτό άτομο, σύμφωνα με τις ισχύουσες στο κράτος μέλος διατάξεις.

## 3.2. Προϊόν από το οποίο λαμβάνονται δείγματα

Κάθε προς ανάλυση παρτίδα αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστής δειγματοληψίας. Σύμφωνα με τις ειδικές διατάξεις που προβλέπονται στο σημείο 5 του παρόντος παραρτήματος, οι μεγάλες παρτίδες πρέπει να υποδιαιρούνται σε υποπαρτίδες, οι οποίες πρέπει να αποτελούν αντικείμενο ξεχωριστής δειγματοληψίας.

## 3.3. Προφυλάξεις

Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας και της προετοιμασίας των δειγμάτων εργαστηρίου, πρέπει να λαμβάνονται προφυλάξεις, προκειμένου να αποφεύγεται οιαδήποτε αλλοίωση, η οποία μπορεί να τροποποιήσει την περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες, να επηρεάσει τις αναλύσεις ή την αντιπροσωπευτικότητα του συνολικού δείγματος.

## 3.4. Στοιχειώδη δείγματα

Κατά το μέτρο του δυνατού, αυτά πρέπει να λαμβάνονται σε διαφορετικά σημεία της παρτίδας ή της υποπαρτίδας. Πρέπει να επισημαίνεται κάθε παρέκκλιση από τον κανόνα αυτό στα πρακτικά που προβλέπονται στο σημείο 3.8.

## ▼B

3.5. *Παρασκευή του συνολικού δείγματος και των δειγμάτων εργαστηρίου (μερικών δειγμάτων)*

Το συνολικό δείγμα λαμβάνεται με χονδρική ανάμειξη των στοιχειωδών δειγμάτων. Μετά την εν λόγω ανάμειξη, το συνολικό δείγμα πρέπει να υποδιωρεθεί σε ίσα επιμέρους δείγματα σύμφωνα με τις ειδικές διατάξεις που προβλέπονται στο σημείο 5 του παρόντος παραρτήματος. Η ανάμειξη είναι αναγκαία προκειμένου να εξασφαλισθεί ότι κάθε επιμέρους δείγμα περιλαμβάνει μέρη ολόκληρης της παρτίδας ή ολόκληρης της υποπαρτίδας.

3.6. *Παρασκευή των ομοίων δειγμάτων*

Από το ομογενοποιημένο δείγμα εργαστηρίου λαμβάνονται όμοια δείγματα, για σκοπούς ελέγχου, δικιπώματος άσκησης προσφυγής και αναφοράς, υπό τον όρο ότι η διαδικασία αυτή είναι σύμφωνη με τις νόμιμες διατάξεις που ισχύουν στο κράτος μέλος.

3.7. *Συσκευασία και αποστολή των δειγμάτων εργαστηρίου*

Κάθε δείγμα εργαστηρίου τίθεται σε ένα καθαρό περιέκτη, από αδρανή ύλη, ο οποίος παρέχει την κατάλληλη προστασία του δείγματος έναντι οιασδήποτε παράγοντα μόλυνσης και από οποιαδήποτε βλάβη που μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Πρέπει να λαμβάνονται επίσης όλες οι αναγκαίες προφυλάξεις για να αποτραπεί κάθε αλλοίωση της σύνθεσης του δείγματος εργαστηρίου, η οποία μπορεί να επέλθει κατά τη διάρκεια της μεταφοράς ή της αποθήκευσης.

3.8. *Σφράγιση και σήμανση των δειγμάτων*

Κάθε επίσημο δείγμα σφραγίζεται στον τόπο της δειγματοληψίας και αναγνωρίζεται σύμφωνα με τις ισχύουσες στο κράτος μέλος διατάξεις. Για κάθε δειγματοληψία, πρέπει να συντάσσονται πρακτικά δειγματοληψίας, τα οποία καθιστούν δυνατή την αναγνώριση, χωρίς αμφισβήτηση, της παρτίδας από την οποία έχει ληφθεί το δείγμα, και πρέπει να αναγράφεται η ημερομηνία και ο τόπος δειγματοληψίας καθώς και κάθε άλλη συμπληρωματική πληροφορία, η οποία μπορεί να αποβεί χρήσιμη για τον παρασκευαστή.

4. *Επεξηγηματικές διατάξεις*4.1. *Διαφορετικοί τύποι παρτίδων*

Τα προϊόντα μπορούν να τεθούν σε εμπορία χύμα, σε εμπορευματοκιβώτια, σε ατομικές συσκευασίες (σάκοι, συσκευασίες λιανικής πώλησης, κ.λπ.). Ο τρόπος δειγματοληψίας μπορεί να εφαρμοσθεί στις διαφορετικές μορφές συσκευασίας, με τις οποίες διατίθενται στην αγορά τα προϊόντα.

Με την επιφύλαξη των ειδικών διατάξεων που προβλέπονται στο σημείο 5 του παρόντος παραρτήματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για τη δειγματοληψία των παρτίδων που τίθενται σε εμπορία σε σάκους ή σε ατομικές συσκευασίες ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Συχνότητα δειγματοληψίας} = \frac{\text{Βάρος της παρτίδας} \times \text{το βάρος του στοιχειώδους δείγματος}}{\text{Βάρος του συνολικού δείγματος} \times \text{το βάρος μιας ατομικής συσκευασίας}}$$

(\*) Βάρος εκφράζεται σε kg.

Συχνότητα δειγματοληψίας: Αριθμός ατομικών συσκευασιών που λαμβάνονται τη λήψη δύο στοιχειωδών δειγμάτων, ενώ κάθε λήψη πραγματοποιείται κάθε ατομική συσκευασία.

4.2. *Βάρος στοιχειώδους δείγματος*

Το βάρος του στοιχειώδους δείγματος είναι περίπου 300 γραμμάρια, εκτός αν το βάρος του δείγματος ορίζεται διαφορετικά στο σημείο 5 του παρόντος παραρτήματος. Σε περίπτωση παρτίδων που συνίστανται σε συσκευασίες λιανικής πώλησης, το βάρος του στοιχειώδους δείγματος εξαρτάται από το μέγεθος της συσκευασίας λιανικής πώλησης.

## ▼ B

## 4.3. Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων για τις παρτίδες που είναι μικρότερες των 15 τόνων

Πλην αντιθέτου ένδειξης στο σημείο 5 του παρόντος παραρτήματος, ο αριθμός των στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν εξαρτάται από το βάρος της παρτίδας, με ελάχιστο το 10 και μέγιστο το 100. Οι αριθμοί του πίνακα που ακολουθεί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του αριθμού των στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν.

**Πίνακας 1:** Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν σε συνάρτηση με το βάρος της παρτίδας

Βάρος της παρτίδας (σε τόνους)	Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων
≤ 0,1	10
> 0,1 - ≤ 0,2	15
> 0,2 - ≤ 0,5	20
> 0,5 - ≤ 1,0	30
> 1,0 - ≤ 2,0	40
> 2,0 - ≤ 5,0	60
> 5,0 - ≤ 10,0	80
> 10,0 - ≤ 15,0	100

## 5. Ειδικές διατάξεις

## 5.1. Γενική σύνοψη του τρόπου δειγματοληψίας για τις αραχίδες, τους καρπούς με κέλυφος, τους ξηρούς καρπούς και τα σιτηρά

**Πίνακας 2:** Υποδιαίρεση των παρτίδων σε υποπαρτίδες σε συνάρτηση με το προϊόν και το βάρος της παρτίδας

Προϊόν	Βάρος της παρτίδας (σε τόνους)	Βάρος ή αριθμός των υποπαρτίδων	Αριθμός των στοιχειωδών δειγμάτων	Συνολικό δείγμα Βάρος/kg
Ξηρά σύκα και άλλοι ξηροί καρποί	≤ 15	15-30 τόννοι	100	30
	< 15	—	10-100 (*)	≤ 30
Αραχίδες, φιστίκια, καρύδια Βραζιλίας και άλλοι ξηροί καρποί με κέλυφος	≥ 500	100 τόννοι	100	30
	> 125 και < 500	5 υποπαρτίδες	100	30
	≥ 15 και ≤ 125	25 τόννοι	100	30
	< 15	—	10-100 (*)	≤ 30
Σιτηρά	≥ 1 500	500 τόννοι	100	30
	> 300 και < 1 500	3 υποπαρτίδες	100	30
	≥ 50 και ≤ 300	100 τόννοι	100	30
	< 50	—	10-100 (*)	1-10

(\*) Σύμφωνα με το βάρος της παρτίδας - βλέπε σημείο 4.3 ή 5.3.

## 5.2. Αραχίδες, φιστίκια, καρύδια Βραζιλίας

Ξηρά σύκα

Σιτηρά (παρτίδες ≥ 50 τόνους)

## 5.2.1. Τρόπος δειγματοληψίας

— Υπό τον όρο ότι οι υποπαρτίδες μπορούν να διαχωριστούν φυσικά, κάθε παρτίδα πρέπει να υποδιαιρείται σε υποπαρτίδες σύμφωνα με τον πίνακα 2 που εμφανίζεται στο σημείο 5.1. Δεδομένου ότι το βάρος των παρτίδων δεν αποτελεί πάντα ακριβές πολλαπλάσιο του βάρους των υποπαρτίδων, το βάρος



των υποπαρτίδων μπορεί να υπερβεί το αναφερόμενο βάρος μέχρι 20 %.

- Κάθε υποπαρτίδα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστής δειγματοληψίας.
- Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων: 100. Στην περίπτωση των παρτίδων κάτω των 15 τόνων, ο αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν εξαρτάται από το βάρος της παρτίδας, με ελάχιστο το 10 και μέγιστο το 100 (βλέπε σημείο 4.3).
- Βάρος του συνολικού δείγματος = 30 kg που πρέπει να υποστεί χονδρική ανάμειξη και να υποδιαιρεθεί σε τρία ίσα επιμέρους δείγματα των 10 kg, πριν από τη σύνθλιψη (η διαίρεση αυτή σε τρία επιμέρους δείγματα δεν είναι αναγκαία στην περίπτωση των αραχίδων, των καρπών με κέλυφος και των ξηρών καρπών που προορίζονται να υποστούν διαλογή ή άλλες φυσικές διαδικασίες και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του εξοπλισμού που είναι σε θέση να ομογενοποιήσει δείγμα 30 kg). Τα συνολικά δείγματα < 10 kg δεν πρέπει να διαιρούνται σε επιμέρους δείγματα.
- Δείγμα εργαστηρίου: ένα επιμέρους δείγμα 10 kg (κάθε επιμέρους δείγμα πρέπει να συνθλίβεται χωριστά σε λεπτομερή σωματίδια και να αναμειγνύεται επιμελώς προκειμένου να εξασφαλίζεται μία πλήρης ομογενοποίηση σύμφωνα με τις διατάξεις του παραρτήματος II).
- Στις περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η εφαρμογή του τρόπου δειγματοληψίας που προαναφέρθηκε, χωρίς να δημιουργηθούν σημαντικές οικονομικές ζημιές (παράδειγματος χάρη λόγω των μορφών συσκευασίας, μέσω μεταφοράς), μπορεί να εφαρμοσθεί ένας κατάλληλος τρόπος δειγματοληψίας, υπό τον όρο ότι η δειγματοληψία είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτική και ότι η εφαρμοζόμενη μέθοδος περιγράφεται εκτενώς και είναι πλήρως τεκμηριωμένη.

#### 5.2.2. Αποδοχή μιας παρτίδας ή υποπαρτίδας

- Για τις αραχίδες, τους καρπούς με κέλυφος και τους ξηρούς καρπούς που προορίζονται να υποστούν διαδικασία διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες:
  - αποδοχή εφόσον το συνολικό δείγμα ή ο μέσος όρος των επιμέρους δειγμάτων είναι σύμφωνος προς το μέγιστο όριο,
  - απόρριψη εφόσον το συνολικό δείγμα ή ο μέσος όρος των επιμέρους δειγμάτων υπερβαίνει το μέγιστο όριο.
- Για τις αραχίδες, τους καρπούς με κέλυφος, τους ξηρούς καρπούς και τα σιτηρά που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο:
  - αποδοχή εφόσον κανένα από τα επιμέρους δείγματα δεν υπερβαίνει το μέγιστο όριο,
  - απόρριψη εφόσον ένα ή περισσότερα επιμέρους δείγματα υπερβαίνει(-ουν) το μέγιστο όριο.
  - Σε περίπτωση συνολικού δείγματος < 10 kg:
    - αποδοχή εφόσον το δείγμα είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο,
    - απόρριψη εφόσον το δείγμα υπερβαίνει το μέγιστο όριο.

#### 5.3. Καρποί με κέλυφος εκτός των αραχίδων, των φιστικιών και των καρυδιών Βραζιλίας

*Ξηροί καρποί εκτός των ξηρών σύκων*

*Σιτηρά (παρτίδες < 50 τόνων)*

##### 5.3.1. Τρόπος δειγματοληψίας

Για τα προϊόντα αυτά, μπορεί να εφαρμοστεί ο τρόπος δειγματοληψίας που προβλέπεται στο σημείο 5.2.1. Ωστόσο, λαμβανομένης υπόψη της συγκριτικά περιορισμένης παρουσίας προσμειξεων που συνδέεται με ορισμένα από τα προϊόντα αυτά ή/και με τις νεότερες μορφές συσκευασίας, στις οποίες τίθενται σε εμπορία τα εν λόγω προϊόντα, μπορεί να εφαρμοστεί ένας άλλος τρόπος δειγματοληψίας (βλέπε σημείο 4.1), υπό τον όρο ότι η δειγματοληψία είναι κατά το δυνατόν αντιπροσωπευτική.

VI

Για τις καρτίδες σιτηρών < 50 τόνων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας τρόπος δειγματοληψίας που εξαρτάται από το βάρος της καρτίδας και περιλαμβάνει 10 έως 100 στοιχειώδη δείγματα των 100 γραμμαρίων, που συγκεντρώνονται σε ένα συνολικό δείγμα 1 έως 10 kg. Τα αριθμητικά στοιχεία του πίνακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, για να προσδιοριστεί ο αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν.

**Πίνακας 3:** Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν σε συνάρτηση με το βάρος της καρτίδας σιτηρών

Βάρος της καρτίδας (σε τόνους)	Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων
≤ 1	10
> 1 - ≤ 3	20
> 3 - ≤ 10	40
> 10 - ≤ 20	60
> 20 - ≤ 50	100

### 5.3.2. Αποδοχή μιας καρτίδας ή υποκαρτίδας

Βλέπε σημείο 5.2.2.

## 5.4. Γάλα

### 5.4.1. Τρόπος δειγματοληψίας

Τρόπος δειγματοληψίας που πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την απόφαση 91/180/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 14ης Φεβρουαρίου 1991, για την καθιέρωση ορισμένων μεθόδων που αφορούν τις αναλύσεις και δοκιμασίες που πραγματοποιούνται στο νερό γάλα και το θερμικά επεξεργασμένο γάλα<sup>(1)</sup>.

— Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων: κατ' ελάχιστο πέντε.

— Βάρος του συνολικού δείγματος: κατ' ελάχιστο 0,5 kg ή λίτρο.

### 5.4.2. Αποδοχή μιας καρτίδας ή υποκαρτίδας

— αποδοχή εφόσον το δείγμα είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο,

— απόρριψη εφόσον το δείγμα υπερβαίνει το μέγιστο όριο.

## 5.5. Παράγωγα προϊόντα και σύνθετα τρόφιμα με περισσότερα συστατικά

### 5.5.1. Γαλακτοκομικά προϊόντα

#### 5.5.1.1. Τρόπος δειγματοληψίας

Τρόπος δειγματοληψίας που πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με την οδηγία 87/524/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 6ης Οκτωβρίου 1987, για τον καθορισμό κοινοτικών μεθόδων δειγματοληψίας με σκοπό τη χημική ανάλυση για τον έλεγχο του κονσερβοποιημένου γάλακτος<sup>(2)</sup>.

Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων: κατ' ελάχιστο πέντε.

Για τα άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα εφαρμόζεται ισοδύναμος τρόπος δειγματοληψίας.

#### 5.5.1.2. Αποδοχή μιας καρτίδας ή υποκαρτίδας

— αποδοχή εφόσον το δείγμα είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο,

— απόρριψη εφόσον το δείγμα υπερβαίνει το μέγιστο όριο.

### 5.5.2. Άλλα παράγωγα προϊόντα που εμφανίζουν λεπτομερή σωματίδια όπως αλεύρι, πάστα σόκων, πάστα αραχιδιών (οποιογενής διασπορά της παρουσίας προσμειξεων από τις αφλατοξίνες)

#### 5.5.2.1. Τρόπος δειγματοληψίας

— Αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων: 100. Στην περίπτωση καρτίδων < 50 τόνων, ο αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων περι-

(<sup>1</sup>) ΕΕ L 93 της 13. 4. 1991, σ. 1.

(<sup>2</sup>) ΕΕ L 306 της 28. 10. 1987, σ. 24.

▼B

λαμβάνεται μεταξύ 10 και 100. Εξαρτάται από το βάρος της καρτίδας (βλέπε πίνακα 3, σημείο 5.3.1).

- Το βάρος του στοιχειώδους δείγματος είναι περίπου 100 γραμμάρια. Στην περίπτωση καρτίδων σε συσκευασίες λιπνικής πάλησης, το βάρος του στοιχειώδους δείγματος εξαρτάται από το μέγεθος της συσκευασίας λιπνικής πάλησης.
- Βάρος του συνολικού δείγματος = 1 έως 100 kg, επαρκώς αναμειγμένο.

#### 5.5.2.2 Αριθμός δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν

- Ο αριθμός συνολικών δειγμάτων που πρέπει να ληφθούν εξαρτάται από το βάρος της καρτίδας. Η υποδιάρθρωση των μεγάλων καρτίδων σε υποκαρτίδες πρέπει να πραγματοποιείται όπως αναφέρεται ►ΜΤ στον πίνακα 2 του σημείου 5.1 ◀ για τα σιτηρά.
- Κάθε υποκαρτίδα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο ξεχωριστής δειγματοληψίας.

#### 5.5.2.3 Αποδοχή μιας καρτίδας ή υποκαρτίδας

- αποδοχή εφόσον το δείγμα είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο,
- απόρριψη εφόσον το δείγμα υπερβαίνει το μέγιστο όριο.

#### 5.6. Άλλα προϊόντα που εμφανίζουν σχετικά χονδροειδή σωματίδια (ετερογενής κατανομή της παρουσίας προσμείξεων από τις αφλατοξίνες)

Τρόπος δειγματοληψίας και αποδοχής σύμφωνα με τις διατάξεις των σημείων 5.2 και 5.3 για τα μη μεταποιημένα γεωργικά προϊόντα.



VB

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Π

Παρασκευή των δειγμάτων και γενικά κριτήρια, στα οποία πρέπει να ανταποκρίνονται οι μέθοδοι ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των περιεκτικότητων σε αφλατοξίνες ορισμένων τροφίμων

## 1. Εισαγωγή

## 1.1. Προφυλάξεις

Σκόπιο είναι να αποφεύγεται κατά το μέτρο του δυνατού το φως της ημέρας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δεδομένου ότι η αφλατοξίνη αποσυντίθεται προοδευτικά υπό την επίδραση της υπερυψίδου ακτινοβολίας. Η αφλατοξίνη δεδομένου ότι κατανέμεται κατά τρόπο ιδιαίτερα ετερογενή, τα δείγματα πρέπει να παρασκευάζονται (και κυρίως να ομογενοποιούνται) με ιδιαίτερη επιμέλεια.

Το σύνολο του προϊόντος που παραλαμβάνεται στο εργαστήριο πρέπει να χρησιμοποιείται για την προπαρασκευή του προϊόντος που πρόκειται να δοκιμασθεί.

## 1.2. Υπολογισμός της αναλογίας κελύφους/πυρήνα στους ολόκληρους καρπούς με κέλυφος

Τα όρια που καθορίζονται για τις αφλατοξίνες από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1525/98 εφαρμόζονται στο εδάδιμο τμήμα του καρπού.

Η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες του εδάδιμου τμήματος μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

- Στους ολόκληρους καρπούς με κέλυφος των δειγμάτων μπορεί να αφαιρεθεί το κέλυφος και η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες αναλύεται στο εδάδιμο τμήμα.
- Ο τρόπος παρασκευής του δείγματος μπορεί να εφαρμοστεί στον ολόκληρο καρπό με το κέλυφος του. Ο τρόπος δειγματοληψίας και ανάλυσης πρέπει εν τοιαύτη περίπτωση να αξιολογήσει το βάρος του πυρήνα του καρπού στο συνολικό δείγμα. Αυτό εκτιμάται αφού οριστεί ένας κατάλληλος συντελεστής για την αναλογία όσον αφορά το κέλυφος σε σχέση με τον πυρήνα στους ολόκληρους καρπούς. Η αναλογία αυτή χρησιμεύει στον προσδιορισμό της ποσότητας πυρήνα στο συνολικό δείγμα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή και την ανάλυση του δείγματος. Για το σκοπό αυτό λαμβάνονται 100 περίπου ολόκληροι καρποί με κέλυφος επί της παρτίδας ή επί του συνολικού δείγματος. Η αναλογία μπορεί να επιτευχθεί ζυγίζοντας 100 περίπου ολόκληρους καρπούς, αφαιρώντας το κέλυφος τους και ζυγίζοντας τις αναλογίες κελύφους και πυρήνα. Η αναλογία του κελύφους σε σχέση με τον πυρήνα, αφού προσδιοριστεί από το εργαστήριο, μπορεί να ληφθεί υπόψη στις εργασίες ανάλυσης, οι οποίες θα πραγματοποιηθούν στη συνέχεια. Ωστόσο, η αναλογία πρέπει να προσδιοριστεί με τη διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω, σε περίπτωση που το δείγμα δεν είναι σύμφωνο προς το μέγιστο όριο.

## 2. Επεξεργασία του δείγματος που παραλαμβάνεται στο εργαστήριο

Κάθε δείγμα εργαστηρίου συνθλίβεται σε λεπτομερή σωματίδια και αναμειγνύεται επιμελώς σύμφωνα με μια μέθοδο που εξασφαλίζει την πλήρη ομογενοποίηση.

## 3. Υποδιάθεση των δειγμάτων για μέτρα εκτέλεσης και μέσα προστασίας

Τα δείγματα ανάλυσης που προορίζονται για την εφαρμογή μέτρων εκτέλεσης για το εμπόριο ή για λόγους διατησίας λαμβάνονται επί των ομογενοποιημένων δειγμάτων εργαστηρίου, υπό τον όρο ότι η διαδικασία αυτή είναι σύμφωνη προς τις ισχύουσες νόμιμες διατάξεις στο κράτος μέλος.

## 4. Μέθοδος ανάλυσης που πρέπει να χρησιμοποιείται από το εργαστήριο και λεπτομέρειες ελέγχου του εργαστηρίου

## 4.1. Ορισμοί

Ορισμένοι από τους ορισμούς που είναι διαδεδομένοι και εφαρμόζονται από τα εργαστήρια είναι οι εξής:



Οι πλέον διαδεδομένες παράμετροι αξιοπιστίας είναι η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα.

- $r$  = επαναληψιμότητα: τιμή κάτω από την οποία είναι δυνατό να αναμένεται ότι η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο μεμονωμένων δοκιμών, τα οποία λαμβάνονται υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (δηλαδή ίδιο δείγμα, ίδιος τεχνικός εξοπλισμός, ίδιο εργαστήριο και σύντομο χρονικό διάστημα) βρίσκεται εντός των ορίων της ειδικής πιθανότητας (κατ' αρχήν 95 %), εξ ου  $r = 2,8 \times s_r$ .
- $s_r$  = τυπική απόκλιση που υπολογίζεται βάσει αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό συνθήκες επαναληψιμότητας.
- $RSD_r$  = σχετική τυπική απόκλιση, η οποία υπολογίζεται βάσει αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό συνθήκες επαναληψιμότητας  $[(s_r/x) \times 100]$ , όπου  $x$  αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των αποτελεσμάτων για όλα τα εργαστήρια και δείγματα.
- $R$  = αναπαραγωγιμότητα: τιμή κάτω από την οποία είναι δυνατό να αναμένεται ότι η απόλυτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεμονωμένων δοκιμών, τα οποία λαμβάνονται υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (δηλαδή για ένα όμοιο προϊόν που λαμβάνεται από τους τεχνικούς σε διάφορα εργαστήρια που χρησιμοποιούν την τυποποιημένη μέθοδο δοκιμής) βρίσκεται εντός ενός ορισμένου ορίου πιθανότητας (κατ' αρχήν 95 %), εξ ου  $R = 2,8 \times S_R$ .
- $s_R$  = τυπική απόκλιση που υπολογίζεται βάσει των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.
- $RSD_R$  = σχετική τυπική απόκλιση που υπολογίζεται βάσει των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό όρους αναπαραγωγιμότητας  $[(S_R/x) \times 100]$ .

#### 4.2. Γενικές απαιτήσεις

Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων πρέπει να ανταποκρίνονται κατά το δυνατόν στις διατάξεις των σημείων 1 και 2 του παραρτήματος της οδηγίας 85/591/ΕΟΚ.

#### 4.3. Ειδικές απαιτήσεις

Εφόσον δεν προβλέπεται σε κοινοτικό επίπεδο καμία ειδική μέθοδος για τον προσδιορισμό των περιεκτικοτήτων των αφλατοξινών στα τρόφιμα, τα εργαστήρια είναι ελεύθερα να εφαρμόσουν τη μέθοδο της επιλογής τους υπό τον όρο ότι τηρεί τα ακόλουθα κριτήρια:

Κριτήριο	Ψαλίδα συγκέντρωσης	Συνιστώμενη τιμή	Μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή
Τυφλές τιμές	Όλες οι συγκεντρώσεις	Αμελητέα	
Ανάκτηση αφλατοξίνης M1	►M1 0,01-0,05 µg/kg ◀ > 0,05 ►M1 µg/kg ◀	60 έως 120 % 70 έως 110 %	
Ανάκτηση αφλατοξινών B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 ►M1 µg/kg ◀ 1-10 ►M1 µg/kg ◀ > 10 ►M1 µg/kg ◀	50 έως 120 % 70 έως 110 % 80 έως 110 %	
Πιστότητα $RSD_R$	Όλες οι συγκεντρώσεις	Παράγωγη της εξίσωσης του Horwitz	2 × την παράγωγη τιμή της εξίσωσης του Horwitz

Η πιστότητα  $RSD_R$  μπορεί να υπολογιστεί με πολλαπλασιασμό της τιμής πιστότητας  $RSD_R$  επί 0,66 στην εκάστοτε συγκέντρωση που παρουσιάζει ενδιαφέρον.

#### Σημειώσεις:

- Οι τιμές ισχύουν τόσο για το B1 καθώς και για το άθροισμα B1+B2+G1+G2.
- Αν πρέπει να καταγραφούν τα αθροίσματα των μεμονωμένων αφλατοξινών B1+B2+G1+G2, το ποσοστό ανάκτησης κάθε μιας

▼ B

από αυτές μέσω της μεθόδου ανάλυσης πρέπει να είναι είτε γνωστό είτε ισοδύναμο.

- Δεν υπάρχει ένδειξη των ορίων ανίχνευσης των χρησιμοποιηθειςών μεθόδων δεδομένου ότι οι τιμές που αφορούν την πιστότητα δίδονται για τις συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον.
- Οι τιμές που αφορούν την πιστότητα υπολογίζονται βάσει της εξίσωσης του Horwitz, ήτοι:  

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$
 Εξίσωση στην οποία:
  - $RSD_R$  αντιπροσωπεύει την σχετική τυπική απόκλιση, η οποία υπολογίζεται βάσει των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται υπό όρους αναπαραγωγιμότητας  $\{(S_x/x) \times 100\}$
  - C είναι το ποσοστό συγκέντρωσης (ήτοι 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Πρόκειται για μια γενική εξίσωση σχετικά με την πιστότητα, η οποία έχει κριθεί ανεξάρτητη της προς ανάλυση ουσίας ή του υλικού, αλλά μόνο συναρτώμενη με τη συγκέντρωση για τις περισσότερες μεθόδους ανάλυσης καθημερινής πρακτικής.

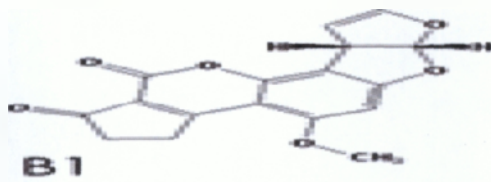
#### 4.4. Υπολογισμός του ποσοστού ανάκτησης

Το αναλυτικό αποτέλεσμα καταγράφεται υπό διορθωμένη ή μη μορφή βάσει της ανάκτησης. Ο τρόπος καταγραφής και το ποσοστό ανάκτησης πρέπει να ανακοινώνονται.

#### 4.5. Πρότυπα ποιότητας των εργαστηρίων

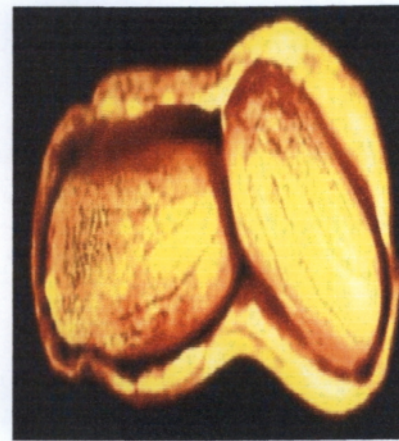
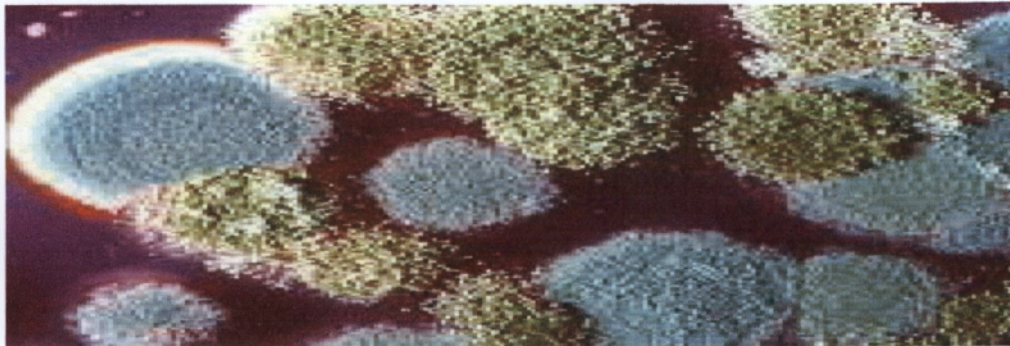
Τα εργαστήρια πρέπει να ανταποκρίνονται στις διατάξεις της οδηγίας 93/99/ΕΟΚ.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V



Ο Συντακτικός τύπος της B<sub>1</sub>(C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)

Οι κίτρινες αποικίες είναι του μύκητα *Aspergillus flavus*, ο οποίος παράγει τις αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> στα φυτικά προϊόντα, ενώ οι πράσινες αποικίες είναι του μύκητα *Penicillium* ο οποίος παράγει άλλες μυκοτοξίνες. (Κεφ.1, Πίνακας Α, Σελ.4).

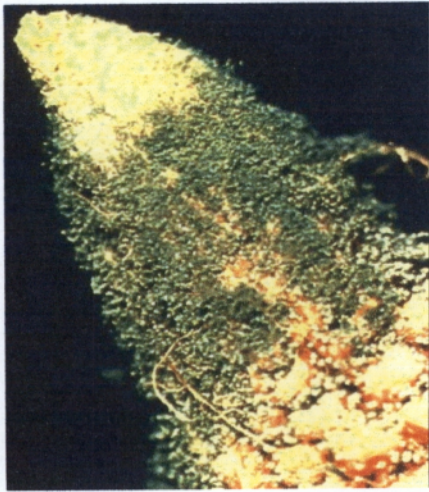


Ο *Aspergillus flavus* στις αραχίδες .



Ο *Aspergillus flavus* στα αμύγδαλα.





Ο *Aspergillus flavus* στο καλαμπόκι.

