Tento dokument slúži čisto na potrebu dokumentácie a inštitúcie nenesú nijakú zodpovednosť za jeho obsah

►**B**

SIEDMA SMERNICA KOMISIE

z 1. marca 1976,

ktorá ustanovuje analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív

(76/372/EHS)

(UL L 102 , 15.4.1976, str. 8)

Zmenené a doplnené:

		Úradný vestník		
		Č.	Strana	Dátum
►**M1**	Smernica Komisie z 30. júla 1981,	L 246	32	29.8.1981
►**M2**	Smernica Komisie 92/95/EHS z 9. novembra 1992,	L 327	54	13.11.1992
►**M3**	Smernica Komisie 94/14/ES z 29. marca 1994,	L 94	30	13.4.1994

▼B

SIEDMA SMERNICA KOMISIE

z 1. marca 1976,

ktorá ustanovuje analytické metódy spoločenstva na úradnú kontrolu krmív

(76/372/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady z 20. júla 1970 o zavedení metód vzorkovania a analýz na úradnú kontrolu krmív v spoločenstve ([1]), naposledy zmenenú a doplnenú Aktom o pristúpení ([2]), a najmä na jej článok 2,

keďže táto smernica vyžaduje, aby sa úradné kontroly krmív vykonávali s použitím metód vzorkovania a analytických metód spoločenstva na kontrolu dodržiavania požiadaviek vyplývajúcich z ustanovení daných zákonmi, inými právnymi predpismi a správnymi opatreniami týkajúcimi sa kvality a zloženia krmív;

keďže smernice Komisie 71/250/EHS z 15. júna 1971 ([3]), 71/393/EHS z 18. novembra 1971 ([4]), 72/199/EHS z 27. apríla 1972 ([5]), 73/46/EHS z 5. decembra 1972 ([6]), 74/203/EHS z 25. marca 1974 ([7]) a 75/84/EHS z 20. decembra 1974 ([8]) už ustanovili určitý počet analytických metód spoločenstva; keďže vzhľadom na pokrok dosiahnutý odvtedy je vhodné schváliť siedmy súbor metód;

keďže opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty vyžadujú, aby sa analýzy na úradné kontroly krmív, pokiaľ ide o obsah aflatoxínu B_1 v nich, vykonávali v súlade s metódami opísanými v prílohe k tejto smernici.

▼M1

▼B

Článok 2

Členské štáty uvedú do účinnosti najneskôr do 1. októbra 1976 zákony, iné právne predpisy a správne opatrenia nevyhnutné na dosiahnutie súladu s touto smernicou. Bezodkladne o tom informujú Komisiu.

Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

([1]) Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) Ú. v. ES L 73, 27.3.1972, s. 14.
([3]) Ú. v. ES L 155, 12.7.1971, s. 13.
([4]) Ú. v. ES L 279, 20.12.1971, s. 7.
([5]) Ú. v. ES L 123, 29.5.1972, s. 6.
([6]) Ú. v. ES L 83, 30.3.1973, s. 21.
([7]) Ú. v. ES L 108, 22.4.1974, s. 7.
([8]) Ú. v. ES L 32, 5.2.1975, s. 26.

▼B

PRÍLOHA

STANOVENIE AFLATOXÍNU B_1

A. JEDNOROZMERNÁ CHROMATOGRAFICKÁ METÓDA NA TENKEJ VRSTVE

▼M2

1. **Účel a rozsah**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah aflatoxínu B1 v surovinách a jednozložkových krmivách: Táto metóda s nemôže použiť pri výskyte citrusovej dužiny. Spodná hranica pre stanovenie je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Pri výskyte interferujúcich látok sa musí analýza opakovať, pričom sa použije metóda B (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia).

▼B

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje chloroformom. Extrakt sa prefiltruje, odoberie sa alikvotná časť a vyčistí sa stĺpcovou chromatografiou na silikagéli. Eluát sa odparí a zvyšok sa znovu rozpustí v známom objeme chloroformu alebo v zmesi benzénu a acetonitrilu. Alikvotná časť tohto roztoku sa podrobí chromatografii na tenkej vrstve (TLC). Množstvo aflatoxínu B_1 sa stanoví po ožiarení chromatogramu ultrafialovým svetlom buď vizuálne, alebo fluorodenzitometricky, porovnaním so známymi množstvami štandardu aflatoxínu B_1. Identita aflatoxínu B_1 vyextrahovaného z krmiva sa musí potvrdiť uvedeným postupom.

3. **Chemikálie**

Poznámka: Všetky chemikálie musia byť „čistoty p. a.“, pokiaľ nie je uvedené inak.

3.1. Acetón.

3.2. Chloroform stabilizovaný prídavkom 0,5 až 1,0 % 96 % etanolu (v/v).

3.3. N – hexán.

3.4. Metanol.

3.5. Bezvodý dietyléter, neobsahujúci peroxidy.

3.6. Zmes benzénu a acetonitrilu: 98/2 (v/v).

3.7. Zmes chloroformu (3.2) a metanolu (3.4): 97/3 (v/v).

3.8. Silikagél na stĺpcovú chromatografiu, veľkosť častíc 0,05 – 0,20 mm.

3.9. Absorbent – vata, vopred odmastená chloroformom, alebo sklená vata.

3.10. Síran sodný, bezvodý, granulovaný.

3.11. Inertný plyn, napr. dusík.

3.12. 1 N kyselina chlorovodíková.

3.13. 50 % (v/v) kyselina sírová.

3.14. Kremelina (hyflosupercel) premytá v kyseline.

3.15. Silikagél G-HR alebo ekvivalentný, na chromatografiu na tenkej vrstve (TLC).

3.16. Štandardný roztok obsahujúci približne 0,1 µg aflatoxínu B_1 na 1ml v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6), pripravený a skontrolovaný spôsobom uvedeným v oddiele 7.

3.17. Štandardný roztok na kvalitatívne testovanie, obsahujúci približne 0,1 µg aflatoxínu B_1 a B_2 na 1ml v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6). Tieto koncentrácie sú na usmernenie. Musia sa upraviť tak, aby sa dosiahla rovnaká intenzita fluorescencie pre obidva aflatoxíny.

3.18. *Vyvíjacie činidlá:*

3.18.1. chloroform (3.2)/acetón (3.1): 9/1 (v/v), nenasýtená kyveta;

3.18.2. dietyléter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 96/3/1 (v/v/v), nenasýtená kyveta;

▼B

3.18.3. dietyléter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 94/4,5/1,5 (v/v/v), nasýtená kyveta;

3.18.4. chloroform (3.2)/metanol(3.4): 94/6 (v/v), nasýtená kyveta;

3.18.5. chloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), nasýtená kyveta;

4. **Prístroje**

4.1. Mlynček-mixér.

4.2. Trepačka alebo magnetická miešačka.

4.3. Skladané filtračné papiere, Schleicher and Schull č. 588, alebo ekvivalentné s priemerom 24 cm.

4.4. Sklená trubica na chromatografiu (vnútorný priemer: 22 mm, dĺžka: 300 mm) s PTFE kohútom a 250 ml zásobníkom.

4.5. Rotačný vákuový odparovač s 500 ml bankou s guľatým dnom.

4.6. 500 ml Erlenmeyerove banky so zábrusovými zátkami.

4.7. Vybavenie na chromatografiu na tenkej vrstve (TLC).

4.8. Sklené platne na TLC, 200 x 200 mm, pripravené nasledujúcim spôsobom (uvedené množstvá stačia na pokrytie piatich platní). Vložte do Erlenmeyerovej banky 30 g silikagélu G-HR (3.15). Pridajte 60 ml vody, zazátkujte a pretrepávajte jednu minútu. Suspenziu natrite na platňu, tak aby sa dosiahla vrstva s rovnomernou hrúbkou 0,25 mm. Nechajte vysušiť na vzduchu a potom skladujte v exsikátore obsahujúcom silikagél. Pred použitím platne aktivujte v sušiarni jednu hodinu pri teplote 110 C.

Kúpené platne sú vhodné vtedy, ak poskytujú výsledky podobné výsledkom získaným na platniach pripravených vyššie uvedeným spôsobom.

4.9. Ultrafialová lampa s dlhou vlnovou dĺžkou (360 nm). Intenzita žiarenia musí byť taká, aby bola škvrna aflatoxínu B_1 s koncentráciou 1 ng zreteľne rozlíšiteľná na TLC platni vo vzdialenosti 10 cm od lampy.

4.10. 10 ml odmerné skúmavky s polyetylénovými zátkami.

4.11. UV spektrofotometer.

4.12. Fluorodenzitometer (ľubovoľný).

5. **Postup**

5.1. *Príprava vzorky (pozri „Poznámky“, časť C, bod 1).*

Vzorku zomeľte tak, aby v celom množstve prešla sitom s veľkosťou ôk 1 mm (v súlade s odporúčaniami ISO R 565).

5.2. *Extrakcia*

Vložte 50 g pomletej, zhomogenizovanej vzorky do 500 ml Erlenmeyerovej banky (4.6). Pridajte 25 g kremeliny (3.14), 25 ml vody a 250 ml chloroformu (3.2). Banku uzatvorte, pretrepávajte alebo miešajte 30 minút pomocou prístroja (4.2) a prefiltrujte cez skladaný filtračný papier (4.3). Prvých 10 ml filtrátu odstráňte a potom zachyťte 50 ml.

5.3. *Čistenie na kolóne*

Vložte do spodnej časti chromatografickej trubice (4.4) zátku z vaty alebo zo sklenej vaty (3.9), trubicu do dvoch tretín naplňte chloroformom (3.2) a pridajte 5 g síranu sodného (3.10).

Skontrolujte, či je horný povrch vrstvy síranu sodného rovný, potom pridajte 10 g silikagélu (3.8) po malých množstvách. Po každom pridaní opatrne premiešajte, aby ste odstránili vzduchové bubliny. Nechajte stáť 15 minút a potom opatrne pridajte 15 g síranu sodného (3.10). Nechajte tekutinu klesnúť tak, aby sa nachádzala tesne nad horným povrchom vrstvy síranu sodného.

Zmiešajte 50 ml extraktu zachyteného podľa bodu 5.2 so 100 ml n-hexánu (3.3) a zmes kvantitatívne preneste na kolónu. Nechajte tekutinu klesnúť tak, aby sa tekutina nachádzala tesne nad horným povrchom vrstvy síranu sodného. Túto premývaciu kvapalinu odstráňte. Potom pridajte 100 ml dietyléteru (3.5) a znovu ho vypustite až po horný povrch vrstvy síranu sodného. Počas týchto postupov dbajte na to, aby bol prietok 8 – 12 ml za minútu a aby kolóna nevyschla. Vytekajúcu kvapalinu odstráňte. Potom premyte pomocou 150 ml zmesi chloroform/metanol (3.7) a celý objem eluátu zachyťte.

▼B

Eluát odparte takmer dosucha pri teplote najviac 50 C v rotačnom odparovači (4.5) prúdom inertného plynu (3.11). Zvyšok kvantitatívne preneste použitím chloroformu (3.2) alebo zmesi benzén-acetonitril (3.6) do 10 ml odmernej skúmavky (4.10). Zvýšte koncentráciu roztoku v prúde inertného plynu (3.11) a objem doplňte na 2 ml chloroformom (3.2) alebo zmesou benzén/acetonitril (3.6).

5.4. *Chromatografia na tenkej vrstve*

Na TLC platňu (4.8) naneste 2 cm od spodného okraja a vo vzdialenostiach 2 cm od seba nižšie uvedené objemy štandardného roztoku a extraktu:

— 10, 15, 20, 30 a 40 µl štandardného roztoku aflatoxínu B_1 (3.16),

— 10 µl extraktu získaného podľa bodu 5.3 a na to *isté miesto* 20 µl štandardného roztoku (3.16),

— 10 a 20 µl extraktu získaného podľa bodu 5.3.

Chromatogram nechajte vyvíjať v tme jedným z vyvíjacích činidiel (3.18). Výber činidla sa musí vykonať vopred nanesením 25 µl štandardného roztoku na kvalitatívne testovanie (3.17) na platňu a kontrolou, či sú po vyvíjaní aflatoxíny B_1 a B_2 úplne oddelené.

Nechajte činidlá odpariť v tme a potom platňu ožiarte UV svetlom tak, že ju umiestnite 10 cm od lampy (4.9). Škvrny aflatoxínu B_1 dávajú modrú fluorescenciu.

5.5. *Kvantitatívne stanovenia*

Stanovte buď vizuálne, alebo fluorodenzitometricky, ako je uvedené ďalej.

5.5.1. Vizuálne stanovenia

Stanovte množstvo aflatoxínu B_1 v extrakte porovnaním intenzity fluorescencie škvŕn extraktu s intenzitou škvŕn štandardného roztoku. Podľa potreby interpolujte. Fluorescencia dosiahnutá navrstvením extraktu na štandardný roztok musí byť intenzívnejšia ako fluorescencia 10 µl extraktu a nesmie tam byť viac ako jedna viditeľná škvrna. Ak bude intenzita fluorescencie, ktorú dáva 10 µl extraktu, väčšia ako intenzita 40 µl štandardného roztoku, zrieďte extrakt predtým, ako ho znovu podrobíte chromatografii, na tenkej vrstve 10- alebo 100-násobne chloroformom (3.2) alebo zmesou benzén/acetonitril (3.6).

5.5.2. Merania fluorodenzitometrom

Zmerajte intenzitu fluorescencie škvŕn aflatoxínu B_1 fluorodenzitometrom (4.12) pri excitačnej vlnovej dĺžke 365 nm a emisnej vlnovej dĺžke 443 nm. Stanovte množstvo aflatoxínu B_1 v škvrnách extraktu porovnaním ich intenzít fluorescencie s intenzitou fluorescencie škvŕn štandardu aflatoxínu B_1

5.6. *Potvrdenie identity aflatoxínu B_1*

Identitu aflatoxínu B_1 v extrakte potvrďte nižšie uvedenými postupmi.

5.6.1. Pôsobenie kyselinou sírovou

Nastriekajte kyselinu sírovú (3.13) na chromatogram získaný v bode 5.4. Fluorescencia škvŕn aflatoxínu B_1 sa musí pri ožiarení UV svetlom zmeniť z modrej na žltú.

5.6.2. Dvojrozmerná chromatografia s tvorbou aflatoxín B_1 – hemiacetalu (alfatoxín B_{2a})

Poznámka: Pri nižšie uvedených postupoch sa musí dôsledne dodržať diagram uvedený na obrázku 3.

5.6.2.1. Nanášanie roztokov

Vyryte dve rovné čiary na platňu (4.8) rovnobežne s priľahlými stranami (6 cm od každej strany), tak aby sa obmedzila migrácia čiel vyvíjacieho činidla. Pomocou kapilárnych pipiet alebo injekčných mikrostriekačiek naneste na platňu nasledujúce roztoky:

— *do bodu A*: objem vyčisteného extraktu vzorky, získaného podľa bodu 5.3, ktorý obsahuje približne 2,5 nm aflatoxínu B_1,

— *do bodov B a C*: 25 µl štandardného roztoku (3.16).

5.6.2.2. Vyvíjanie

Chromatrogram nechajte vyvíjať v smere I v tme s vyvíjacím činidlom (3.18.1) (1 cm vrstva v nenasýtenej kyvete) dovtedy, kým čelo činidla nedosiahne medznú čiaru činidla.

▼B

Vyberte platňu z nádoby a nechajte schnúť v tme pri laboratórnej teplote päť minút. Potom striekajte kyselinu chlorovodíkovú (3.12) v páse s výškou 2,5 cm, ktorý pokrýva body A a B (vyznačené na obr. 3 vyšrafovanou plochou) dovtedy, kým nestmavne, pričom zvyšok platne chráňte sklenou tabuľou. Nechajte reagovať 10 minút v tme a vysušte prúdom vzduchu pri laboratórnej teplote.

Potom chromatogram nechajte vyvíjať v smere II v tme s vyvíjacím činidlom (3.18.1) (1 cm vrstva v nenasýtenej kyvete) dovtedy, kým čelo vyvíjacieho činidla nedosiahne medznú čiaru činidla. Vyberte platňu z kyvety a nechajte vyschnúť pri laboratórnej teplote.

5.6.2.3. Interpretácia chromatogramu

Preskúmajte chromatogram pod UV svetlom (4.9) a skontrolujte nasledujúce charakteristické znaky.

a) Vznik modrej fluoreskujúcej škvrny aflatoxínu B_1 pochádzajúcej zo štandardného roztoku naneseného v bode C (migrácia v smere I).

b) Vznik modrej fluoreskujúcej škvrny nezreagovaného (s kyselinou chlorovodíkovou) aflatoxínu B_1 a intenzívnejšie modrofluoreskujúca škvrna aflatoxín B_1 – hemiacetálu, pričom obidve pochádzajú zo štandardného roztoku naneseného v bode B (migrácia v smere II).

c) Vznik škvŕn podobajúcich sa škvrnám opísaným v b), ktoré pochádzajú z extraktu vzorky naneseného v bode A. Poloha týchto škvŕn je definovaná v prvom rade migračnou vzdialenosťou aflatoxínu B_1 z bodu A v smere I (rovnaká ako tá, ktorú prešiel štandard nanesený v bode C) a následne migračnými vzdialenosťami v smere II aflatoxínu B_1 – hemiacetálu z tohto miesta (rovnaká ako tá, ktorú prešiel štandard nanesený v bode B). Intenzita fluorescencie škvŕn hemiacetálu pochádzajúceho z extraktu a zo štandardu naneseného v bode B by mala byť rovnaká.

6. Výpočet výsledkov

6.1. *Z vizuálnych stanovení*

Obsah aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na kg vzorky (ppb) je daný vzorcom:

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

v ktorom:

Y a X sú objemy v mikrolitroch štandardného roztoku aflatoxínu B_1 (3.16) a extraktu, ktoré majú podobnú intenzitu fluorescencie;

S = koncentrácia aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na 1 ml v štandardnom roztoku (3.16);

V = konečný objem extraktu v mikrolitroch, s prihliadnutím na všetky riedenia, ktoré boli vykonané;

W = hmotnosť vzorky v gramoch, zodpovedajúca objemu extraktu prečisteného na kolóne.

6.2. *Z fluorodenzitometrických meraní*

Obsah aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na kg vzorky (ppb) je daný vzorcom:

$$\frac{S \cdot V}{W \cdot V}$$

v ktorom:

Y = objem extraktu v mikrolitroch, nanesený na platňu (10 alebo 20 µl);

S = množstvo aflatoxínu B_1 v nanogramoch vo škvrne extraktu (proporcionálne k danej hodnote Y), vypočítané z meraní;

V = konečný objem extraktu v mikrolitroch, s prihliadnutím na všetky riedenia, ktoré boli vykonané;

W = hmotnosť vzorky v gramoch, zodpovedajúca objemu extraktu prečisteného na kolóne.

▼B

7. **Príprava a skúšanie štandardného roztoku (3.16)**

7.1 *Stanovenie koncentrácie aflatoxínu B_1*

Pripravte štandardný roztok aflatoxínu B_1 v chloroforme (3.2) alebo v zmesi benzén/acetonitril (3.6) s koncentráciou 8 až 10 µg/ml. Pomocou spektrofotometra (4.11) stanovte absorpčné spektrum medzi 330 a 370 nm.

Zmerajte absorbanciu (A) pri 363 nm v chloroformovom roztoku; alebo pri 348 nm v roztoku v zmesi benzén/acetonitril.

Vypočítajte koncentráciu aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na ml roztoku z nasledujúcich vzorcov:

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{20\,600}$ ak ide o chloroformový roztok;

$\frac{312 \cdot A \cdot 1\,000}{19\,800}$ ak ide o roztok zmesi benzén/acetonitril.

Ak je to vhodné, zrieďte mimo pôsobenia denného svetla, tak aby ste získali pracovný štandardný roztok s koncentráciou aflatoxínu B_1 približne 0,1 µg/ml. Ak sa roztok uchováva v chladničke pri teplote 4 ° C, je stály dva týždne.

7.2 *Skúšanie chromatografickej čistoty*

Naneste na platňu (4.8) 5 µl štandardného roztoku aflatoxínu B_1 obsahujúceho 8 až 10 µg/ml aflatoxínu B_1 (7.1). Chromatogram nechajte vyvíjať spôsobom uvedeným v bode 5.4. V UV svetle sa môže na chromatograme objaviť len jedna škvrna a v pôvodne nanesenej zóne nesmie byť žiadna fluorescencia.

8. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných v tej istej vzorke tým istým pracovníkom nesmie presiahnuť:

— 25 % z vyššej hodnoty pre obsahy aflatoxínu B_1 od 10 do 20 µg/kg,

— 5 µg, v absolútnej hodnote pre obsahy vyššie ako 20 a do 50 µg/kg,

— 10 % z vyššej hodnoty pre obsahy nad 50 µg/kg.

9. **Reprodukovateľnosť**

Pozri „Poznámky“, bod 2 časti C.

▼M2

B. STANOVENIE AFLATOXÍNU B_1. METÓDA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE

1. **Účel a rozsah**

Táto metóda je na stanovenie aflatoxínu B_1 v krmivách pre zvieratá, vrátane krmív obsahujúcich citrusovú dužinu. Spodná hranica pre stanovenie je 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. **Podstata metódy**

Vzorka sa extrahuje chloroformom. Extrakt sa filtruje a pomerná časť sa prečistí na florisilovej patróne a potom na patróne C_{18}. Konečná separácia a stanovenie sa dosiahne vysokoúčinnou kvapalnou chromatografiou (HPLC) s použitím reverznej fázy kolóny C_{18}, po ktorej nasleduje pokolónová derivatizácia jódom vo vode, a fluoroscentnej detekcie.

Poznámka:

mykotoxíny sú veľmi toxické látky. Odporúča sa narábať s nimi v určenom digestore. Osobitné bezpečnostné opatrenia by sa mali prijať pre prípady, keď toxíny sú v suchom stave, pretože majú elektrostatickú povahu a následkom toho majú tendenciu rozptýliť sa po pracovisku.

▼M2

3. **Činidlá**

3.1. Chloroform, stabilizovaný 0,5 až 1,0 hmotnostným percentom etanolu. Pozri poznámku 10.2.

3.2. Metanol, čistoty HPLC pre preatáciu 3.6.

3.3. Acetón.

3.4. Acetonitril, čistoty HPLC.

3.5. Premývacie rozpúšťadlá: Pripraví sa jeden deň pred použitím, alebo ultrazvukom sa v rozpúšťadle odstráni vzduch.

3.5.1. Zmes acetónu (3.3) a vody, 98 + 2 (v + v).

3.5.2. Zmes vody a metanolu (3.2) a vody, 80 + 20 (v + v).

3.5.3. Zmes vody a acetónu (3.3), 85 + 15 (v + v).

3.6. Mobilná fáza pre HPLC

Zmes vody, metanolu (3.2) a acetonitrilu (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v).

Poznámka: V závislosti na vlastnostiach použitej HPLC kolóny môže vzniknúť potreba upraviť zloženie rozpúšťadla v mobilnej fáze.

3.7. Nasýtený jódový roztok: Do 400 ml vody dajte 2 g jódu. Zmiešavajte najmenej 90 minút a prefiltrujte cez membránový filter. (4.15). Nasýtený roztok chráňte pred svetlom, aby sa zabránilo fotodegradácii.

3.8. Kyselinou premytý celit 545, alebo jeho ekvivalent.

3.9. Florisilová patróna (Waters SEP-PAK), alebo podobné.

3.10. Patróna C18 (Waters SEP-PAK), alebo podobné.

3.11. Inertný plyn, napr. dusík.

3.12. Štandardný roztok aflatoxínu B_1 v chloroforme, koncentrácia 10 µg/ml. Prekontrolujte koncentráciu roztoku týmto spôsobom: pomocou spektrofotometra (4.23) stanovte absorpčné spektrum roztoku medzi 330 a 370 nm. Odmerajte absorbanciu (A) pri maximálnej hodnote 363 nm. Vypočítajte koncentráciu aflatoxínu B_1 v mikrogramoch na mililiter roztoku pomocou tohto vzorca:

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

3.12.1. Zásobný štandardný roztok aflatoxínu B_1 v chloroforme.

Kvantitatívne preneste 2,5 ml štandardného roztoku aflatoxínu B_1 (3.12) do odmernej banky s obsahom 50 ml a upravte po značku s chloroformom (3.1). Tento roztok skladujte na chladnom tmavom mieste (pri teplote 4 °C), dôkladne utesnený a zabalený v hliníkovej fólii.

3.13. HPLC kalibračných roztokov aflatoxínu B_1.

Poznámka:

Na prípravu týchto roztokov použite laboratórne sklo umyté kyselinou (pozri bod 4 – Aparatúra).

3.13.1. Kalibračný roztok 4ng/ml.

V hliníkovej fólii zohrievajte odmernú banku so zásobným štandardným roztokom (3.12.1) až na izbovú teplotu (niekoľko hodín). Preneste 400 ml zásobného štandardného roztoku (200 ng aflatoxínu B_1) do odmernej banky s obsahom 50 ml, a roztok odparujte dosucha v prúde inertného plynu (3.11).

Rozpusťte získané rezíduum v približne 20 ml zmesi vody a acetónu (3.5.3), doplňte po značku zmesou vody a acetónu a dobre zamiešajte.

3.13.2. Kalibračný roztok 3 ng/ml.

Kvantitatívne preneste 7,5 ml kalibračného roztoku (3.13.1) do odmernej banky s obsahom 10 ml, doplňte po značku zmesou vody a acetónu (3.5.3) a dobre premiešajte.

3.13.3. Kalibračný roztok 2 ng/ml.

▼M2

Kvantitatívne preneste 25 ml kalibračného roztoku (3.13.1) do odmernej banky s obsahom 50 ml, doplňte po značku zmesou vody a acetónu (3.5.3) a dobre premiešajte.

Tento roztok sa taktiež uvádza ako referenčný etalón, ktorý sa má používať pri opakovanom vstreknutí počas HPLC (5.5).

3.13.4. Kalibračný roztok 1 ng/ml.

Kvantitatívne preneste 2,5 ml kalibračného roztoku (3.13.1) do odmernej banky s obsahom 10 ml, doplňte po značku zmesou vody a acetónu (3.5.3) a dobre premiešajte.

3.14. Ampula obsahujúca zmes aflatoxínov B_1, B_2, G_1 a G_2 koncentrácie približne 1, 0,5, 1 a prípadne 0,5 mg/ml v 1 ml chloroformu.

3.14.1. Chromatografický skúšobný roztok.

Preneste obsah ampuly (3.14) do skúmavky uzavretej sklenou zátkou alebo do liekovky uzavretej šrubovacím vrchnákom. Preneste 40 ml tohto roztoku do skúmavky uzavretej sklenou zátkou (vypláchnutej kyselinou) (4.22). Odparujte chloroform prúdom inertného plynu (3.11) a znova rozpusťte v 10 ml zmesi vody a acetónu (3.5.3).

3.15. Činidlá pre potvrdzujúcu skúšku (6).

3.15.1. Roztok chloridu sodného.

3.15.2. Síran sodný, bezvodý, granulovaný.

4. **Aparatúra**

Upozornenie: Použtie laboratórneho skla neumytého kyselinou pre vodné roztoky aflatoxínov môže spôsobiť straty. Pozornosť je potrebné venovať najmä novému laboratórnemu sklu, ako sú napríklad liekovky na automatický odber vzoriek a Pasteurove pipety. Laboratórne sklo, ktoré prichádza do styku a vodnými roztokmi aflatoxínov, by sa preto malo na niekoľko hodín ponoriť do zriedenej kyseliny (napr. kyseliny sírovej = 2 mol/l) a potom dôkladne vypláchnuť destilovanou vodou, aby sa odstránili všetky stopy kyseliny (napr. trikrát, a skontrolujte to pH-papierom). V praxi je tento postup potrebný pre banky s guľatým dnom (4.4), odmerné banky, odmerné valce, liekovky alebo skúmavky používané pre kalibračné roztoky a konečné extrakty (konkrétne liekovky pre autosamplery), a Pasteurove pipety, ak sa používajú na prenos kalibračných roztokov alebo extraktov.

4.1. Mlynček – mixér.

4.2. Sito s otvormi, ktoré majú veľkosť 1,0 mm, (ISO R 565).

4.3. Mechanická trepačka.

4.4. Rotačná vákuová odparka, so 150 ml až 250 ml bankou s guľatým dnom.

4.5. Vysokovýkonný kvapalný chromatograf, striekačka s dávkovačom určeným na vstrekovanie 250 ml. Pozri návody výrobcov pre čiastočné alebo úplné náplne dávkovača.

4.6. Analytická kolóna pre HPLC: balenie 3 µm alebo 5 µm C18.

4.7. Neimpulzové čerpadlo na podávanie jódového pokolónového činidla.

4.8. Fiting Valco s nulovým vlastným objemom, nehrdzavejúca oceľ (1/16” × 0,75 mm).

4.9. Špirálová reakčná cievka; teflón alebo nehrdzavejúca oceľ. Zistilo sa, že vhodné sú rozmery 3 000 × 0,5 mm až 5 000 × 0,5 mm v kombinácii s 5 µm alebo 3 µm HPLC kolónami.

4.10. Termostaticky riadený vodný kúpeľ prispôsobený na 60 °C, s možnosťou regulácie teploty na viac ako 0,1 °C.

4.11. Fluorescenčný detektor s excitačnou vlnovou dĺžkou 365 nm a emisnou vlnovou dĺžkou 435 nm. (Pre filtrovacie zariadenie: emisná vlnová dĺžka > 400 nm). Musí umožniť zistiť aspoň 0,05 ng aflatoxínu B1. Odporúča sa trocha spätného tlaku (napr. škrtiaci ventil, teflónová cievka alebo cievka z nehrdzavejúcej ocele pripojená na výpust detektora), na potlačenie vzduchových bublín v prietokovej komore.

4.12. Záznamník s registračným pásikom.

4.13. Elektronický integrátor (dobrovoľne).

▼M2

4.14. Priemer skladaného filtračného papiera: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 alebo ekvivalent.

4.15. Membránový filter s veľkosťou pórov 0,45 μm, Millipore HAWP 04700 alebo ekvivalent.

4.16. Kónická banka s obsahom 500 ml, uzavretá sklenou zátkou.

4.17. Sklená kolóna (vnútorný priemer približne 1 cm, dĺžka približne 30 cm) s Luerovým hrotom.

4.18. Luerov uzatvárací kohútik odolný proti chloroformu (napr. Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J. T. Baker 4514 alebo ekvivalentný).

4.19. Chemicky odolná injekčná striekačka, 10 ml Luerov konektor.

4.20. Injekčná striekačka vhodná na HPLC vstrieknutie 250 μl (pozri 4.5).

4.21. 100 ml injekčná mikrostriekačka na prípravu kalibračných roztokov (skontrolujte, či presnosť je v rámci 2 % hmotnosti).

4.22. 10 ml kalibrované rúrky uzavreté sklenou zátkou.

4.23. Spektrofotometer, určený na vykonávanie meraní v UV oblasti spektra.

4.24. Vybavenie pre potvrdzujúcu skúšku (6).

4.24.1. 100 ml separačný lievik s teflónovým kohútikom a prepláchnutý kyselinou.

4.24.2. Ohrievací blok, 40 až 50 °C.

5. **Postup**

5.1. *Príprava vzorky.*

Vzorku zomeľte tak, aby prešla cez sito (4.2)

5.2. *Skúšobná časť vzorky.*

Odvážte 50 g pripravenej skúšobnej vzorky do kónickej banky (4.16).

5.3. *Extrakcia*

Do skúšobnej časti vzorky pridajte 25 g celitu (3.8), 250 ml chloroformu (3.1) a 25 ml vody (5.2). Banku zazátkujte a pretrepávajte 30 minút ma mechanickej trepačke (4.3). Prefiltrujte cez skladaný filtračný papier (4.14). Zachyťte 50 ml filtrátu. V prípade potreby vezmite pomernú časť filtrátu a rozpusťte na 50 ml chloroformom tak, aby koncentrácia aflatoxínu B_1 nebola vyššia ako 4 ng/ml.

5.4. *Prečistenie (postup by sa mal vykonať bez podstatného prerušenia).*

Upozornenie:

— pri vykonávaní analýzy primerane chráňte laboratórium pred denným svetlom. Účinne sa to dá urobiť tak, že použijete:

i) Fólia absorbujúca UV svetlo na oknách v kombinácii s tlmeným svetlom (bez priameho slnečného svetla);

ii) záclony alebo rolety v kombinácii s umelým svetlom (prijateľné sú žiarivky).

— Aflatoxín s obsahom roztokov sa musí čo možno najviac chrániť pred svetlom (uchovávajte v tme, použite hliníkovú fóliu).

5.4.1. Čistenie florisilom SEP-PAK

5.4.1.1. Príprava zostavy kolóna-patróna

Pripojte uzatvárací kohútik (4.18) ku kratšiemu násadcu florisilovej patróny (3.9) [pozri obrázok 1]. Patrónu umyte a odstráňte pomôcku, tak, že vezmete 10 ml chloroformu (3.1) a rýchlo preženiete 8 ml kohútikovým uzáverom cez patrónu s použitím injekčnej striekačky (4.19). Pripojte dlhšiu časť násadca patróny na sklenú kolónu (4.17) a prežeňte zostávajúce 2 ml chloroformu cez patrónu do kolóny. Uzavrite kohútik. Odstráňte injekčnú striekačku.

5.4.1.2. Čistenie

Do zbernej kolóny-patróny pridajte filtrát uvedený v 5.3 a nechajte samovoľne odtiecť. Vypláchnite pomocou 5 ml chloroformu (3.1) a potom 20 ml metanolu (3.2). Eluáty vylejte. Počas týchto operácií zabezpečte, aby kolóna-patróna nevyschla.

▼M2

Eluujte aflatoxín B_1 pomocou 40 ml zmesi acetónu a vody (3.5.1) a zachyťte celý eluát v banke s guľatým dnom rotačnej odparky (4.4). Eluát zahusťujte na rotačnej odparke pri 40 °C až 50 °C až dovtedy, kým sa nevydestiluje všetok acetón. (*Poznámka:* tu zostane v banke približne 0,5 ml kvapaliny. Z pokusov vyplynulo, že ďalšie odparovanie nie je škodlivé a že ak zostane 0,5 ml kvapaliny, nenachádza sa tu významné množstvo acetónu. Rezíduá acetónu by mohli viesť k stratám aflatoxínu B_1 na patróne C_{18}). Pridajte 1 ml metanolu (3.2), rýchlym krúživým pohybom banky obsah premiešavajte, aby sa aflatoxín B_1 rozpustil na stenách banky, pridajte 4 ml vody, a premiešajte. Odpojte a vyprázdnite patrónu. Sklenú kolónu vypláchnite vodou a ponechajte ju na purifikačný krok C_{18}.

5.4.2. Čistenie pomocou C_{18} SEP-PAK

5.4.2.1. Príprava zostavy kolóna-patróna

Pripojte uzatvárací kohútik (4.18) ku kratšiemu násadcu patróny C_{18} (3.10) [pozri obrázok 1]. Naplňte patrónu a pomocou striekačky odstráňte všetok vzduch tak, že preženiete 10 ml metanolu (3.2) kohútikovým uzáverom cez patrónu (4.19) (Vzduchové bubliny v patróne sú viditeľné ako svetlé škvrny na pozadí, ktoré má inokedy sivastú farbu). Vezmite 10 ml vody a cez patrónu prežeňte 8 ml (pri vystriedaní metanolu vodou zabráňte vniknutiu vzduchu do patróny). Pripojte dlhšiu časť násadca patróny na sklenú kolónu (4.17) a prežeňte zostávajúce 2 ml vody cez patrónu do kolóny. Uzavrite kohútik. odstráňte injekčnú striekačku.

5.4.2.2. Čistenie

Do sklenej kolóny (4.17) kvantitatívne preneste extrakt zachytený v 5.4.1.2, prepláchnite banku dvakrát 5 ml zmesi vody a metanolu (3.5.2) a nechajte samovoľne odtiecť. Počas týchto operácií zabezpečte, aby kolóna-patróna nevyschla. (Ak sa v priehradke v blízkosti patróny vytvárajú vzduchové bubliny, zastavte prietok a otvorte ventil na vrchu sklenej kolóny, aby sa odstránili vzduchové bubliny. Potom pokračujte). Eluujte pomocou 25 ml zmesi vody a metanolu. Vypusťte eluát. Eluujte aflatoxín B_1 pomocou 50 ml zmesi vody a acetónu (3.5.3) a zachyťte všetok eluát v 50 ml odmernej banke. Doplňte po značku vodou a premiešajte. Výsledný skúšobný roztok sa použije na chromatografiu (5.5).

Upozornenie: *Kone*čný extrakt sa pred HPLC zvyčajne nemusí filtrovať. Ak je to nevyhnutné, nepoužívajú sa celulózové filtre, pretože by to mohlo viesť k stratám aflatoxínu B_1. Prijateľné sú teflónové filtre.

5.5. *Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia*

(Montáž zariadenia pozri na obrázku 2). Na aklimatizáciu a stabilizáciu nástrojov poskytnite dostatok času.

Poznámka 1:

Prietoky dané pre mobilnú fázu a pokolónové činidlo sú iba orientačné. Možno ich bude potrebné upraviť v závislosti na vlastnostiach HPLC kolóny.

Poznámka 2:

Reakcia detektora na aflatoxín B_1 závisí od teploty, a preto by sa drift mal kompenzovať (pozri obrázok 3). Vstreknutím pevne stanoveného množstva referenčného etalónu aflatoxínu B1 (3.13.3) v pravidelných intervaloch (t. j. každé tretie vstreknutie), maximálne hodnoty aflatoxínu B_1 medzi týmito referenčnými etalónmi sa môžu opraviť použitím strednej hodnoty odozvy, za predpokladu, že rozdiel medzi reakciami po sebe nasledujúcich referenčných úrovní je veľmi malý (< 10 %). Vstreknutia sa preto musia vykonať bez prerušenia. Ak je prerušenie nevyhnutné, referenčným etalónom musí byť posledné vstreknutie pred prerušením a prvé vstreknutie po prerušení (3.13.3). Pretože kalibračná krivka je lineárna a prechádza cez východiskový bod, množstvá aflatoxínu B_1 v extrakte vzorky sa určia priamo odkazom na susedné úrovne.

5.5.1. Nastavenie čerpadla HPLC

Nastavte čerpadlo HPLC (4.5), aby sa dosiahol prietok 0,5 alebo 0,3 ml/min pre 5 mm alebo 3 mm kolónu HPLC (4.6) s použitím mobilnej fázy (3.6).

▼M2

5.5.2. Nastavenie pokolónového čerpadla

Nastavte čerpadlo (4.7) tak, aby prietok vodného roztoku nasýteného jódom bol 0,2 až 0,4 ml/min (3.7). Pre približnú orientáciu: Odporúča sa prietok približne 0,4 alebo 0,2 ml/min v kombinácii s prietokom 0,5 a prípadne 0,3 ml/min mobilnej fázy (3.6).

5.5.3. Fluorescenčný detektor

Nastavte fluorescenčný detektor (4,11) na excitačnú vlnovú dĺžku = 365 nm a em = 435 nm (filtračný nástroj; > 400 nm). Nastavte detektorový tlmič tak, aby ste získali približne 80 % z vychýlenia plného rozsahu zapisovača pre 1 ng aflatoxínu B1.

5.5.4. Injektor

Platí pre všetky roztoky – vstrekujte 250 µl množstvá podľa návodu výrobcu injektora.

5.5.5. Kontrola chromatografickej separácie

Vstreknite chromatografický skúšobný roztok (3.14.1). Hodnoty sediel by mali byť nižšie ako 5 % súčtu maximálnych hodnôt susedných vrcholov.

5.5.6. Kontrola stability systému

Pred každým súborom analýz vstrekujte referenčný etalón (3.13.3), až kým sa nedosiahnu stabilné plochy pod zónou (*Poznámka*: Špičkové odozvy pre aflatoxín B1 medzi vstreknutiami po sebe nasledujúcimi by sa nemali odlišovať o viac ako 6 %). Vzápätí ihneď pokračujte kontrolou linearity (5.5.7).

5.5.7. Kontrola linearity

Vstrekujte kalibračné roztoky aflatoxínu B1 (3.13.1 až 3.13.4). Na opravu driftu v odozve sa pri každom treťom vstreknutí použije referenčný etalón (3.13.3) (*Poznámka*: Špičková odozva pre tento referenčný etalón sa nesmie za 90 minút odlišovať o viac ako o 10 %). Opravte drift podľa vzorca v bode 7. Kalibračný graf by mal byť lineárny a mal by prechádzať východiskovým bodom, v rámci štandardnej odchýlky odhadu Y. Zistené hodnoty sa od nominálnych hodnôt nesmú odlišovať o viac ako o 3 %. Ak sú splnené tieto podmienky, ihneď pokračujte ďalej. Ak nie sú splnené, zistite a opravte zdroj problému skôr ako budete pokračovať.

5.5.8. Vstrekovanie vzoriek extraktov

Vstrekujte vyčistené extrakty vzoriek (5.4.2.2). Vždy po dvoch vzorkách extraktov opakujte vstrekovanie referenčného etalónu (3.13.3) v tomto poradí: referenčný etalón, extrakt, extrakt, referenčný etalón, extrakt, extrakt, referenčný etalón atď.

6. Overovacia skúška

6.1. *Ďalšie ošetrenie extraktu (5.4.2.2)*

Do konečného extraktu, získaného pri 5.4.2.2., pridajte 5 ml roztoku chloridu sodného (3.15.1). Každý extrahujte v separačnom lieviku trikrát pomocou 2 ml chloroformu (3.1) počas jednej minúty (4.21.1). Do skúmavky s obsahom 10 ml nalejte kombinované extrakty chloroformu na približne 1 g síranu sodného (3.15.2). Malý lievik (priemer: 4 cm) môže sa použiť s kúskom bavlny v priehradke, pokrytom približne 1 g síranu sodného.

Premyte vrstvu síranu sodného niekoľkými mililitrami chloroformu a zachyťte povlak do tej istej skúmavky. V tej istej skúmavke odparte extrakt chloroformu dosucha s použitím ohrievacieho bloku (4.24.2) a znova rozpusťte v 1 ml chloroformu.

6.2. *Príprava derivácie a tenkovrstvovej chromatografie:*

Pozri prílohu k smernici Rady 76/372/EHS metóda A bod 5.6.2.

7. Výpočet výsledkov

Obsah aflatoxínu B_1 (mm/kg) prítomného vo vzorke sa vypočíta pomocou tohto vzorca:

$$\text{obsah aflatoxínu B1 v}\mu g/kg = \frac{m \times V_{ext}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

pričom:

▼**M2**

m = množstvo aflatoxínu B_1 v ng zastúpené píkom B_1 vzorky, vypočítané takto:

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

P (vzorka) = plocha pod zónou aflatoxínu B_1 pre vzorku

$P\ (st_1)$ = plocha pod zónou aflatoxínu B_1 vyplývajúca z predchádzajúceho vstreknutia referenčného etalónu (3.13.3)

$P\ (st_2)$ = plocha pod zónou aflatoxínu B_1 vyplývajúca z nasledujúceho vstreknutia referenčného etalónu (3.13.3)

r(st) = vstreknuté množstvo aflatoxínu B_1 v referenčnom etalóne (3.13.3) v ng

V_m = objem vstreknutého extraktu vzorky v ml

V_{ext} = konečný objem extraktu vzorky v ml s prihliadnutím na všetky vykonané riedenia (5.3)

M = hmotnosť vzorky v g

V_f = objem filtrátu prenesený na florisilovú patrónu (5.4.1.2) v ml

V_c = objem chloroformu použitý na extrakciu vzorky v ml

Ak postup prebieha tak, ako v tomto protokole, vzorec sa redukuje na:

obsah aflatoxínu B_1 v mg/kg = 20 × m.

7.1. Výsledky sa môžu vypočítať aj pomocou merania výšky píku.

8. **Opakovateľnosť:**

pozri v bode 10.1.9.

9. **Reprodukovateľnosť:**

pozri v bode 10.1.

10. **Pozorovania**

10.1. *Presnosť*

Z porovnávacej štúdie ([1]), vykonanej na medzinárodnej úrovni na zmiešaných krmivách, vyplynuli výsledky pre opakovateľnosť a reprodukovateľnosť uvedené v tabuľke 1. Termín opakovateľnosť r), ktorý je tu použitý, je vymedzený ako najväčší pomer, ktorý nie je významný pri 95 % úrovni pravdepodobnosti pre porovnávanie dvoch odčítaní údajov tej istej vzorky v tom istom laboratóriu za podobných podmienok. Termín reprodukovateľnosť (R) je podobne vymedzený pre porovnávanie dvoch odlišných laboratórií. V zhode s ISO 3534 – 1977, 2.35 ([2]) a rozhodnutím Komisie 89/610/EHS ([3]) r a R sú tiež uvedené v tabuľke 1 vo význame variačných koeficientov.

Tabuľka 1

Opakovateľnosť r) a reprodukovateľnosť (R) vyjadrené ako pomery a zodpovedajúce variačné koeficienty

(15 laboratórií)

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

(*) CV = variačný koeficient

([1]) Egmond, H.P van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E (1991). Food nad Contaminants 8, 17-29.
([2]) ISO 3534-1977.
([3]) Ú. v. ES L 351, 2.12.1989, s. 39.

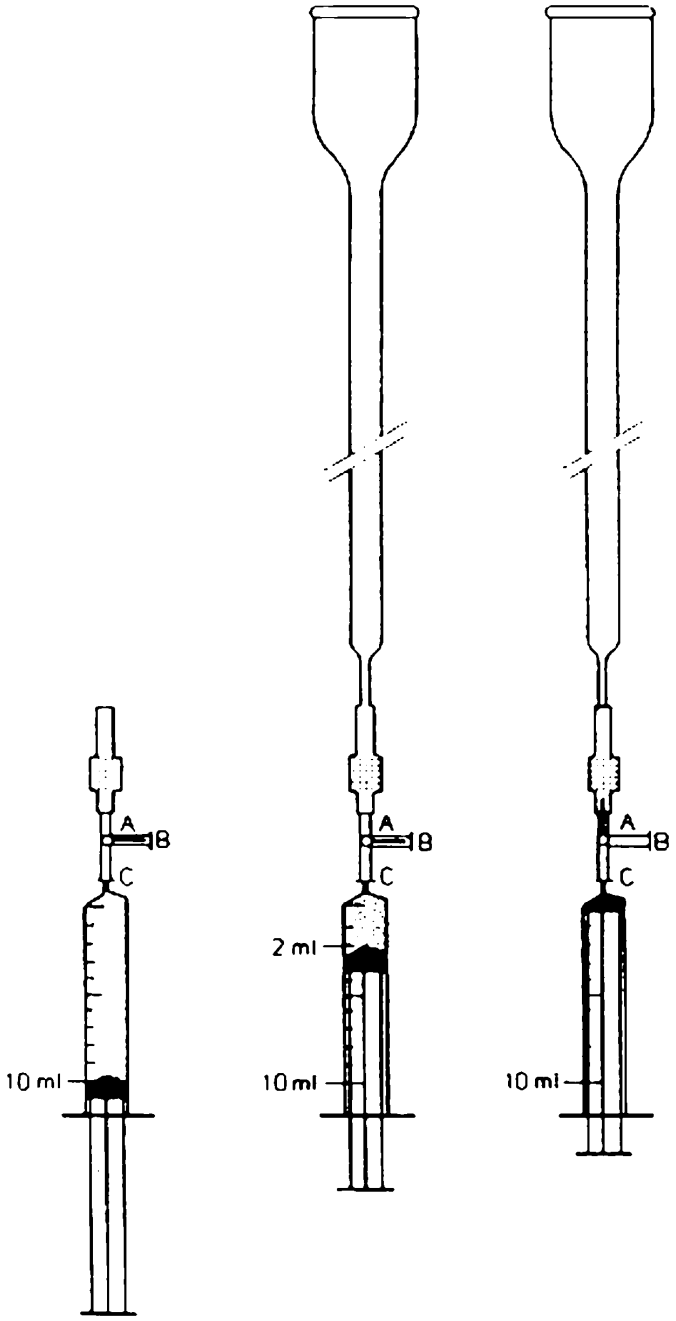
▼**M2**

10.2. *Stabilizácia chloroformu (3.1)*

Adsorpčné vlastnosti florisilovej patróny sa môžu zmeniť, ak sa použijú iné stabilizátory ako etanol. Malo by sa to overiť v súlade s bodom 10.3, keď nie je k dispozícii opísaný chloroform.

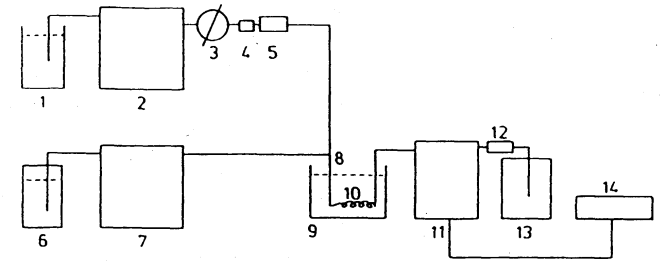
10.3. *Presnosť*

Správnosť použitie metódy sa musí overiť opakovanými meraniami na certifikovaných referenčných materiáloch. Ak nie sú k dispozícii, vykonanie danej metódy by sa malo overiť regeneračnými pokusmi na obohatených slepých vzorkách. Odchýlka od priemeru skutočnej hodnoty, vyjadrená v percentách skutočnej hodnoty, sa nesmie nachádzať mimo hraníc od mínus 20 % do plus 10 %.



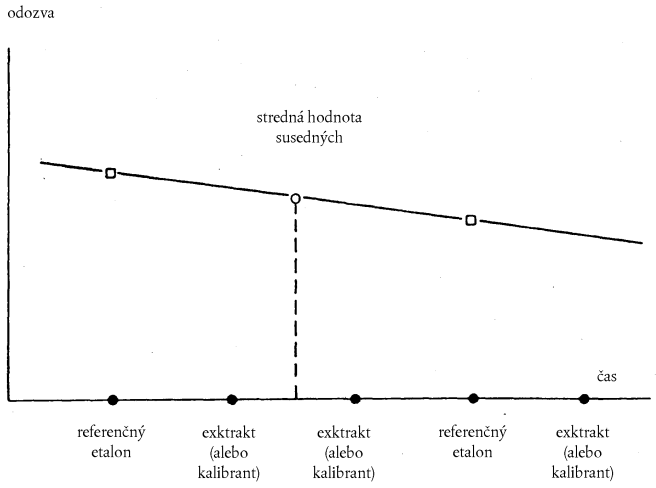
Obrázok 1: Zostava kolóna-patróna

▼**M2**



1. Mobilná fáza
2. Čerpadlo
3. Vstrekovací ventil
4. Ochranná kolónka
5. Analytická kolóna pre HPLC
6. Nasýtený jódový roztok
7. Čerpadlo činidla
8. Odbočnica v tvare T
9. Termostaticky riadený kúpeľ
10. Špiralovitá reakčná cievka
11. Fluorescenčný detektor
12. Škrtiaci ventil
13. Nečistoty
14. Záznamník/integrátor s registračným pásikom.

Obrázok 2: Prietokový diagram LC systému s jódovou pokolónovou derivatizáciou



Obrázok 3: Vyrovnávanie driftu v odozve aflatoxínu B_1 vstreknutím referenčného etalónu (3.13.3) v pravidelných intervaloch

▼**M3**

C. POZNÁMKY TÝKAJÚCE SA METÓD A A B

1. **Odtučnenie**

   Vzorky obsahujúce viac ako 5 % tuku sa musia po úpravách uvedených v bode 5.1. odtučniť petroléterom (bod varu 40 až 60 °C).

   V takýchto prípadoch sa analytické výsledky musia vyjadriť v hmotnosti neodtučnenej vzorky.

2. **Reprodukovateľnosť výsledkov, ak ide o metódu A**

   Reprodukovateľnosť výsledkov, t. j. odchýlka medzi výsledkami získanými v dvoch alebo viacerých laboratóriách v tej istej vzorke bola odhadnutá na:

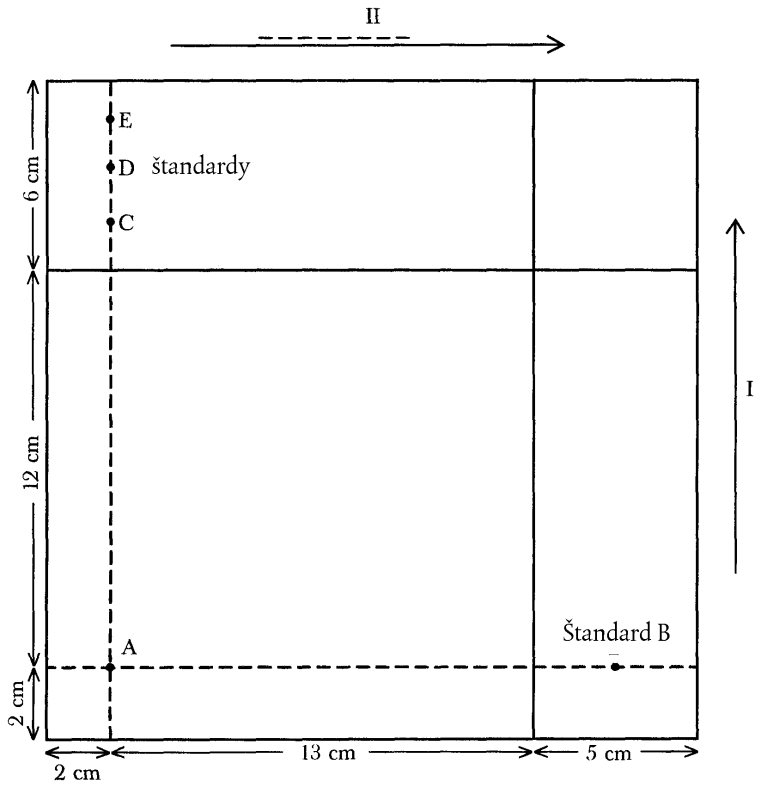
   ± 50 % z priemernej hodnoty pre priemerné hodnoty aflatoxínu B od 10 do 20 µg/kg;

   ± 10 µg/kg od priemernej hodnoty pre priemerné hodnoty väčšie ako 20 do 50µg/kg;

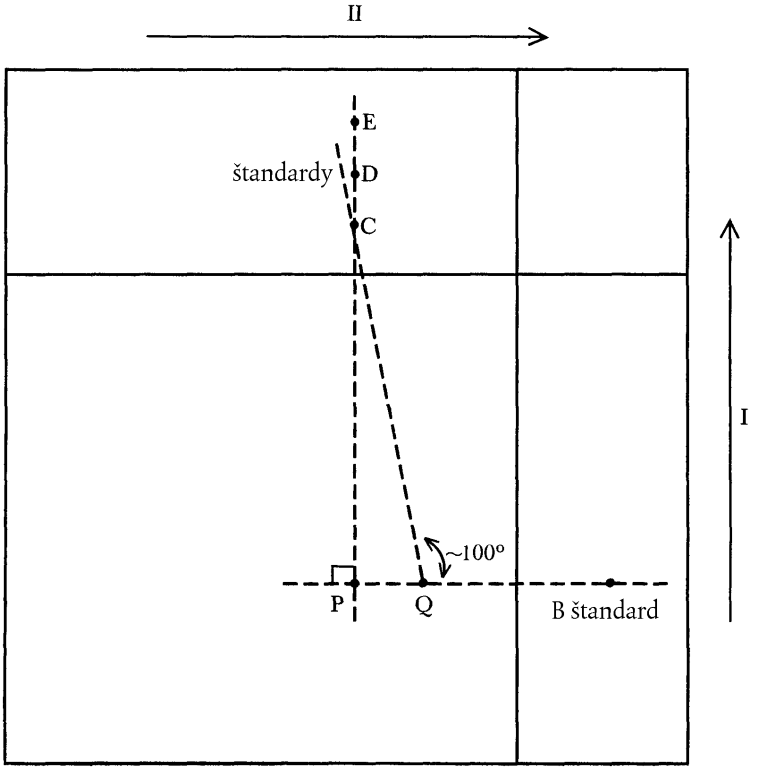
   ± 20 % z priemernej hodnoty pre priemerné hodnoty väčšie ako 50 µg/kg.

▼**B**

Dodatok k prílohe

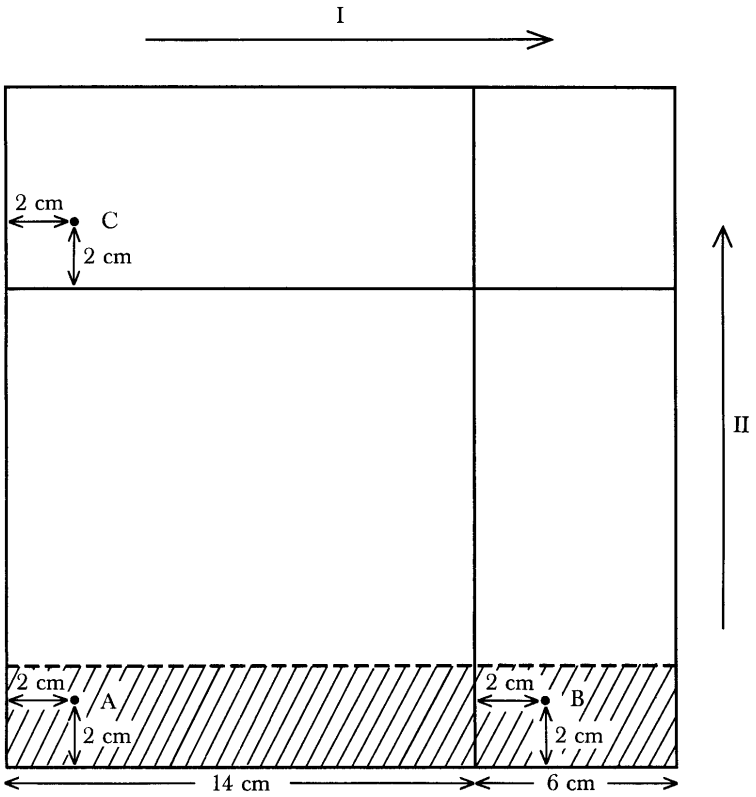


Obrázok 1



Obrázok 2

▼B



Obrázok 3