

31992L0095

L 327/54

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

13.11.1992

SMĚRNICE KOMISE 92/95/EHS**ze dne 9. listopadu 1992,****kterou se mění příloha sedmé směrnice Komise 76/372/EHS, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv ⁽¹⁾, naposledy pozměněnou aktem o přistoupení Španělska a Portugalska, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,vzhledem k tomu, že sedmá směrnice Komise 76/372/EHS ze dne 1. března 1976, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv ⁽²⁾ ve znění směrnice 81/680/EHS ⁽³⁾ stanoví metody, které se mají používat pro stanovení aflatoxinu B1;vzhledem k vývoji vědeckotechnických poznatků jsou důvody k úpravě těchto metod; že je zejména žádoucí mít k dispozici dostupnou metodu kontroly velmi nízkých mezních hodnot pro aflatoxin, stanovených ve směrnici Rady 74/63/EHS ze dne 17. prosince 1973 o stanovení maximálních přípustných limitů nežádoucích látek a produktů ve výživě zvířat ⁽⁴⁾, naposledy pozměněné směrnicí 91/132/EHS ⁽⁵⁾;

vzhledem k tomu, že je rovněž žádoucí mít k dispozici metodu stanovení aflatoxinu B1, pokud jsou přítomny rušivé látky, jako je např. citrusová pulpa;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Příloha směrnice 76/372/EHS se mění v souladu s přílohou této směrnice.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. října 1993. Neprodleně o nich informují Komisi.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 9. listopadu 1992.

Za Komisi

Ray MAC SHARRY

člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.⁽²⁾ Úř. věst. L 102, 15.4.1976, s. 8.⁽³⁾ Úř. věst. L 246, 29.8.1981, s. 32.⁽⁴⁾ Úř. věst. L 38, 11.2.1974, s. 31.⁽⁵⁾ Úř. věst. L 66, 13.3.1991, s. 16.

PŘÍLOHA

- I. V části A „Metoda jednorozměrné chromatografie na tenké vrstvě“ se text v bodě 1 „Účel a oblast použití“ nahrazuje tímto:

„1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovit obsah aflatoxinu B1 v těchto surovinách a krmných surovinách. Tuto metodu nelze použít, je-li přítomna citrusová pulpa. Dolní mezní hodnota stanovitelnosti je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Pokud jsou přítomny rušivé látky, je nutné analýzu opakovat podle metody B (vysokoúčinné kapalinové chromatografie).“

- II. V části B „Metoda dvourozměrné chromatografie na tenké vrstvě“ se text nahrazuje tímto:

„B. STANOVENÍ AFLATOXINU B1 METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE**1. Účel a rozsah**

Tato metoda slouží ke stanovení aflatoxinu B1 v krmivech včetně takových, která obsahují citrusovou pulpu. Dolní mezní hodnota stanovitelnosti je 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. Princip

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se filtruje a jeho alikvotní část se čistí na patroně s Florisilem a následně na patroně s C18. Konečného rozdělení a stanovení se dosáhne vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s použitím kolony s reverzní fází C18 a s následnou postkolonovou derivatizací vodným roztokem jódu a fluorescenční detekcí.

Poznámka:

Mykotoxiny jsou mimořádně toxické látky. Manipulace s nimi by se měla provádět v určených digestořích. Zvláštní opatření je třeba přijmout v případě, kdy toxiny jsou v suchém stavu, protože jsou elektrostatické a mohou se rozptylovat do pracovního prostředí.

3. Činidla

- 3.1. Chloroform, stabilizovaný 0,5–1,0 % ethanolu (hmotnostně). Viz poznámku 10.2.
- 3.2. Methanol, čistoty HPLC, pro přípravu podle bodu 3.6.
- 3.3. Aceton
- 3.4. Acetonitril, čistoty HPLC
- 3.5. Eluční roztoky – připravují se jeden den před použitím nebo se z nich odstraní vzduch ultrazvukem.

- 3.5.1. Směs acetonu (3.3) a vody 98 + 2 (v/v)
- 3.5.2. Směs vody a methanolu (3.2), 80 + 20 (v/v)
- 3.5.3. Směs vody a acetonu (3.3), 85 + 15 (v/v)

3.6. Mobilní fáze pro HPLC

Směs vody, methanolu (3.2) a acetonitrilu (3.4), 130 + 70 + 40 (v/v/v).

Poznámka: Složení mobilní fáze může být potřeba upravit v závislosti na vlastnostech použité kolony HPLC.

- 3.7. Nasycený roztok jódu: Do 400 ml vody se přidá 2 g jódu. Míchá se nejméně 90 minut a potom se přefiltruje přes membránový filtr (4.15). Připravený roztok se musí chránit před světlem, aby nedocházelo k fotodegradaci.
- 3.8. Kyselinou promytý Celit 545 nebo ekvivalentní
- 3.9. Florisilová patrona (Waters SEP-PAK) nebo ekvivalent
- 3.10. Patrona s C18 (Waters SEP-PAK) nebo ekvivalent
- 3.11. Inertní plyn, např. dusík

- 3.12. Aflatoxin B1, standardní roztok v chloroformu, koncentrace 10 µg/ml Koncentrace roztoku se zkontroluje takto: na spektrofotometru (4.23) se stanoví absorpční spektrum při 330 až 370 nm. Změří se absorbance (A) maxima v oblasti kolem 363 nm. Vypočítá se koncentrace aflatoxinu B1 (X) v mikrogramech na mililitr roztoku podle tohoto vzorce:

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

- 3.12.1. Aflatoxin B1, zásobní standardní roztok v chloroformu

Do 50 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 2,5 ml standardního roztoku aflatoxinu B1 (3.12) a doplní se po značku chloroformem (3.1). Roztok se skladuje v chladu (4 °C) a temnu v dobře uzavřené nádobě, obalené fólií z hliníku.

- 3.13. Aflatoxin B1, kalibrační roztoky pro HPLC

Poznámka:

Na přípravu těchto roztoků se používá sklo předem umyté v kyselině (viz odstavec 4, Přístroje)

- 3.13.1. Kalibrační roztok 4 ng/ml

Odměrná baňka se standardním zásobním roztokem (3.12.1) zabalená ve fólii z hliníku se nechá zahřát na pokojovou teplotu (několik hodin). Do 50 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 400 µl standardního zásobního roztoku (200 ng aflatoxinu B1) a rozpouštědlo se odpaří do sucha v proudě inertního plynu.

Zbytek po odpaření se rozpustí v asi 20 ml směsi voda-aceton (3.5.3), doplní se touto směsí po značku a dobře se promíchá.

- 3.13.2. Kalibrační roztok 3 ng/ml

Do 10 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 7,5 ml kalibračního roztoku (3.13.1), doplní se směsí voda-aceton (3.5.3) po značku a dobře se promíchá.

- 3.13.3. Kalibrační roztok 2 ng/ml.

Do 50 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 25 ml kalibračního roztoku (3.13.1), doplní se směsí voda-aceton (3.5.3) po značku a dobře se promíchá.

Tímto roztokem se použije jako referenční standard používaný pro opakovaný nástřik během HPLC (5.5.)

- 3.13.4. Kalibrační roztok 1 ng/ml

Do 10 ml odměrné baňky se kvantitativně převede 2,5 ml kalibračního roztoku (3.13.1), doplní se směsí voda-aceton (3.5.3) po značku a dobře se promíchá.

- 3.14. Ampule obsahující směs aflatoxinů B1, B2, G1 a G2 v koncentracích přibližně 1, 0,5, 1 a 0,5 µg/ml, v 1 ml chloroformu

- 3.14.1. Roztok pro chromatografický test

Obsah ampule (3.14) se kvantitativně převede do zkumavky se skleněnou zátkou nebo do lahvičky se šroubovacím uzávěrem. Potom se 40 µl tohoto roztoku kvantitativně převede do zkumavky předem vymyté v kyselině, která má skleněnou zátku (4.22). Chloroform se odpaří v proudě inertního plynu (3.11) a zbytek po odpaření se rozpustí v 10 ml směsi voda-aceton (3.5.3).

- 3.15. Činidla pro potvrzující test (6)

- 3.15.1. Chlorid sodný, nasycený roztok

- 3.15.2. Síran sodný, bezvodý, granulovaný

4. Přístroje a pomůcky

Upozornění: Používání skla pro vodné roztoky aflatoxinů, které nebylo umyto v kyselině, může způsobit ztráty. Zvláštní péče musí být věnována novému sklu a sklu na jedno použití, jako jsou např. lahvičky do autosampleru a Pasteurovy pipety. Z tohoto důvodu se laboratorní sklo, které přichází do styku s vodnými roztoky aflatoxinů, ponoří na několik hodin do zředěné kyseliny (např. kyseliny sírové o koncentraci 2 mol/l), potom se dobře opláchne destilovanou vodou, aby se odstranily veškeré zbytky kyseliny (např. třikrát a kontroluje se pH papírkem). V praxi je tento postup nezbytný pro baňky s kulatým dnem (4.4), odměrné baňky, odměrné válce, lahvičky nebo zkumavky používané na kalibrační roztoky a konečné extrakty (zejména lahvičky do autosampleru) a Pasteurovy pipety, pokud se používají pro přelítí kalibračních roztoků nebo extraktů.

- 4.1. Drtič – mixér.

- 4.2. Síto s oky o velikosti 1,0 mm (ISO R 565)
- 4.3. Mechanická třepačka
- 4.4. Rotační vakuová odparka sabaňka s kulatým dnem o objemu 150 až 250 ml
- 4.5. Vysokoučinný kapalinový chromatograf, vstřikovací systém se smyčkou vhodnou pro nástřik 250 ml. Viz návod k použití od výrobce pro částečnou nebo úplnou náplň smyčky.
- 4.6. Analytická kolona pro HPLC: náplň C18 3 µm nebo 5 µm
- 4.7. Bezpulzní čerpadlo pro jodové postkolonové činidlo
- 4.8. T-spojka s nulovým mrtvým objemem Valco, korozivzdorná ocel, (1/16 × 0,75 mm)
- 4.9. Spirálová reakční smyčka; z teflonu nebo korozivzdorné oceli. Rozměry 3000×0,5 mm až 5000×0,5 mm jsou vhodné v kombinaci s HPLC kolonami s náplní 3 µm nebo 5 µm.
- 4.10. Termostatem řízená vodní lázeň nastavená na 60 °C, schopná regulace teploty v rozmezí ± 0,1 °C.
- 4.11. Fluorescenční detektor s excitační vlnovou délkou 365 nm a emisní vlnovou délkou 435 nm. (Pro detektory s filtry: emisní vlnová délka >400 nm). Detektor musí být schopný detekce nejméně 0,05 ng aflatoxinu B1. Doporučuje se určitý zpětný tlak (např. restriktor, teflonová nebo nerezová smyčka připojená k výstupu detektoru), aby se potlačily vzduchové bubliny v průtočné kyvetě.
- 4.12. Zapisovač
- 4.13. Elektronický integrátor (nepovinné)
- 4.14. Skládaný filtrační papír o průměru 24 cm, Macherey-Nagel 617 ¼ nebo ekvivalent
- 4.15. Membránový filtr s póry 0,45 µm, Millipore HAWP 04700 nebo ekvivalent
- 4.16. Erlenmayerova baňka o objemu 500 ml se zábrusovou zátkou
- 4.17. Skleněná kolona (vnitřní průměr přibližně 1 cm, délka přibližně 30 cm) se zakončením Luer
- 4.18. Chloroformu odolný uzavírací kohout Luer (např. Bio-Rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T. Baker 4514) nebo ekvivalent
- 4.19. Chemicky odolné injekční stříkačky, 10 ml Luer konektor
- 4.20. Injekční stříkačky vhodné pro dávkování 250 µl do přístroje HPLC (4.5)
- 4.21. Injekční mikrostříkačky 100 µl na přípravu kalibračních roztoků (zajistí se, aby přesnost byla nejméně 2 % hmotnostní)
- 4.22. Kalibrované zkumavky o obsahu 10 ml se zábrusovými zátkami
- 4.23. Spektrofotometr vhodný pro měření v UV oblasti spektra
- 4.24. Vybavení pro potvrzovací test (6)
- 4.24.1. Kyselinou vypláchnutá dělicí nálevka o objemu 100 ml s teflonovým uzavíracím kohoutem
- 4.24.2. Tepelný blok, 40–50 °C

5. Postup

5.1. Příprava vzorku

Vzorek se rozmělní takovým způsobem, aby prošel sítem (4.2).

5.2. Zkušební dávka

Do Erlenmayerovy baňky se naváží 50 g připraveného zkušební vzorku (4.16).

5.3. Extrakce

Ke zkušební navážce (5.2) v Erlenmayerově baňce se přidá 25 g Celitu (3.8), 250 ml chloroformu (3.1) a 25 ml vody. Baňka se zazátkuje a třepe se 30 minut na mechanické třepačce (4.3). Přefiltruje se přes skládaný filtrační papír (4.14) a jímá se 50 ml filtrátu. Je-li to nezbytné, odebere se alikvotní část filtrátu a rozředí se do 50 ml chloroformem (3.1), aby koncentrace aflatoxinu B1 nebyla vyšší než 4 ng/ml.

5.4. Pročištění (postup se musí provést bez významných přerušení)

Upozornění:

— laboratoř, kde se provádí analýzy, se náležitě chrání před denním světlem. Účinně se toho dosáhne použitím např.:

- (i) fólií absorbující UV záření na oknech v kombinaci s tlumeným světlem (ne přímé sluneční světlo),
- (ii) záclonami nebo roletami v kombinaci s umělým osvětlením (vhodné jsou zářivky).

— Roztoky obsahující aflatoxiny se musí co nejvíce chránit před světlem (uchovávat v temnu, chránit fólií z hliníku).

5.4.1. Čištění Florisilem SEP-PAK

5.4.1.1. Příprava spojení kolony a patrony

Uzavírací kohout (4.18) se spojí s kratší stopkou Florisilové patrony (3.9) (viz obr. 1). Patrona se promyje a odstraní se z ní vzduch 10 ml chloroformu (3.1) tak, že se 8 ml pomocí injekční stříkačky (4.19) protlačí rychle patronou přes uzavírací kohout. Delší stopka patrony se připojí ke skleněné koloně (4.17) a zbývající 2 ml chloroformu se protlačí přes patronu do kolony. Uzavírací kohout se uzavře. Injekční stříkačka se odpojí.

5.4.1.2. Čištění

Filtrát, který se získá podle odstavce 5.3. se přidá na spojenou kolonu a patronu a nechá se stéci. Kolona s patronou se propláchně 5 ml chloroformu (3.1) a poté 20 ml methanolu (3.2) a spojené eluáty se odstraní. Během těchto úkonů se zajistí, aby kolona s patronou nevyschla.

Aflatoxin B1 se eluuje 40 ml směsí aceton-voda (3.5.1) a celý eluát se jímá do odpařovací baňky rotační odparky (4.4). Na rotační odparce při teplotě 40–50 °C se koncentruje eluát, než se dokončí destilace acetonu. (Pozn.: V baňce zůstane asi 0,5 ml kapaliny. Testy ukázaly, že další odpařování není škodlivé a že pokud zbude asi 0,5 ml kapaliny, již tam není významné množství acetonu. Zbytky acetonu by mohly vést ke ztrátám aflatoxinu B1 na patronce s náplní C18.) Přidá se 1 ml methanolu (3.2), intenzivním mícháním se rozpustí aflatoxin B1 na stěnách baňky, přidají se 4 ml vody a promíchá se. Patrona se sejme a oddělí od kolony. Skleněná kolona se opláchně vodou a použije se pro čištění s C18.

5.4.2. Čištění přes patronu s C18 SEP-PAK

5.4.2.1. Příprava spojení kolony a patrony

Uzavírací kohout (4.18) se spojí s kratší stopkou patrony s C18 (3.10) (viz obr. 1). Patrona se zaplní a odstraní se z ní vzduch rychlým protlačením 10 ml methanolu (3.2) pomocí injekční stříkačky (4.19) přes uzavírací kohout. (Bubliny vzduchu jsou v patroně viditelné jako světlé skvrny na jinak šedavém pozadí.) Nanese se 10 ml vody a 8 ml se nechá volně protéct přes patronu. (Při přechodu methanolu na vodu je třeba vyhnout se pronikání vzduchu do patrony.) Delší stopka patrony se připojí ke skleněné koloně (4.17) a zbývající 2 ml vody se protlačí přes patronu v koloně. Uzavírací kohout se uzavře. Injekční stříkačka se odpojí.

5.4.2.2. Čištění

Extrakt, který se získá podle odstavce 5.4.1.2, se kvantitativně převede do skleněné kolony (4.17), přičemž odpařovací baňka se dvakrát vypláchně 5 ml směsí voda-methanol (3.5.2), a nechá se stéci. Během těchto úkonů se zajistí, aby kolona s patronou nevyschla. (Pokud se vytvoří vzduchové bubliny v zúžení blízko patrony, zastaví se průtok a poklepáváním na skleněnou kolonu se vzduchové bubliny odstraní. Poté se pokračuje.) Kolona s patronou se dále promyje 25 ml směsí voda-methanol (3.5.2), eluát se vylije. Aflatoxin B1 se eluuje 50 ml směsí voda-aceton (3.5.3.) a celý eluát se jímá do 50 ml odměrné baňky. Baňka se doplní vodou po značku a promíchá se. Výsledný roztok se použije k chromatografii.

Upozornění: Obvykle není filtrace konečného extraktu před HPLC nutná. Pokud je považována za nutnou, nesmí se používat celulózový filtr, protože by to mohlo vést ke ztrátám aflatoxinu B1. Vhodný je teflonový filtr.

5.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

(viz obrázek 2 pro sestavení zařízení.) Poskytne se dostatek času pro kondicionování a stabilizování přístrojů.

Poznámka 1:

Rychlost průtoku mobilní fáze a postkolonového čidla je pouze informativní. Může se upravit podle vlastností kolony HPLC.

Poznámka 2:

Odezva detektoru na aflatoxin B1 závisí na teplotě, proto je třeba vyrovnat posun (viz obr. 3). Pravidelným (např. každý třetí vstřík) nástřikem stanoveného množství referenčního standardu aflatoxinu B1 (3.13.3) lze napravit vrcholové hodnoty aflatoxinu B1 mezi těmito referenčními standardy použitím střední hodnoty odezvy za předpokladu, že rozdíl mezi dvěma odezvami po sobě následujících referenčních standardů je velmi malý (<10 %). Proto je nutné provádět nástřik bez přerušení. Pokud je nutné přerušení, poslední a první nástřik před přerušením musí být referenční standard (3.13.3). Protože kalibrační křivka je lineární a prochází počátkem, je možné přímo stanovit obsah aflatoxinu B1 v extraktu vzorku s ohledem na přílehlý standard.

5.5.1. Nastavení čerpadla HPLC

Čerpadlo přístroje HPLC (4.5) se nastaví tak, aby průtok mobilní fáze (3.6) pro HPLC kolonu (4.6) s náplní 5 µm byl 0,5 ml/min a s náplní 3 µm byl 0,3 ml/min.

5.5.2. Nastavení postkolonového čerpadla

Čerpadlo (4.7) se nastaví tak, aby průtok nasyceného vodného roztoku jódu (3.7) byl 0,2 až 0,4 ml/min. Jako hrubé vodítko: průtok nastavený na 0,4 ml/min je žádoucí v kombinaci s průtokem mobilní fáze (3.6) 0,5 ml/min a průtok 0,2 ml/min pro průtok mobilní fáze 0,3 ml/min.

5.5.3. Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor (4.11) se nastaví na excitační vlnovou délku 365 nm a emisní délku 435 nm (přístroje s filtry > 400 nm). Citlivost detektoru pro 1 ng aflatoxinu B1 se nastaví asi na 80 % celkového rozsahu stupnice pera.

5.5.4. Vstřikovací systém

Pro všechny roztoky se nástřikuje množství 250 µl podle návodu k použití od výrobce vstřikovacího systému.

5.5.5. Kontrola chromatografické separace

Provede se nástřik roztoku pro chromatografický test (3.14.1). Sedla by měla být méně než 5 % součtu výšek píků přílehlých píků.

5.5.6. Kontrola stability systému

Před každým souborem analýz se opakovaně nástřikuje referenční standard (3.13.3), dokud se nezískají stabilní plochy píků. (Pozn.: Odezva aflatoxinu B1 mezi po sobě následujícími vstřiky se nesmí lišit o více než 6 %). Po kontrole stability systému se bezodkladně provede kontrola linearit (5.5.7).

5.5.7. Kontrola linearit

Provede se nástřik kalibračních roztoků aflatoxinu B1 (3.13.1 až 3.13.4). Po každém třetím nástřiku se dává referenční standard (3.13.3) pro nápravu posunu v odezvě. (Pozn.: Rozdíl mezi odezvami referenčních standardů se v průběhu 90 minut nesmí lišit o více než 10 %). Posun se napraví podle vzorce v odstavci 7. Kalibrační graf by měl být lineární a procházet počátkem v rozsahu dvojnásobné směrodatné chyby odhadu Y. Zjištěné hodnoty se nesmí lišit o více než 3 % nominální hodnoty. Pokud jsou splněny tyto podmínky, pokračuje se bezodkladně. Pokud tomu tak není, než se pokračuje, musí se určit a napravit zdroj problému.

5.5.8. Nástřik extraktu vzorku

Provede se nástřik přečištěného extraktu (5.4.2.2). Vždy po dvou vzorcích se provede nástřik referenčního standardu (3.13.3) podle následujícího pořadí: referenční standard – extrakt – extrakt – referenční standard atd.

6. Potvrzující test**6.1. Další postup s extraktem**

Ke konečnému extraktu získanému podle odstavce 5.4.2.2 se přidá 5 ml roztoku chloridu sodného (3.15.1). Extrahují se třikrát 2 ml chloroformu (3.1) v dělicí nálevce (4.24.1) po dobu 1 minuty. Spojené chloroformové extrakty se převedou přes asi 1 g síranu sodného (3.15.2) do 10 ml zkumavky. Může být použita např. malá dělicí nálevka (o průměru 4 cm) s kouskem vaty v zúžení, pokrytým síranem sodným.

Vrstva síranu sodného se propláchně několika ml chloroformu a eluát se jímá do stejné zkumavky. Chloroformový extrakt se odpaří do sucha v té samé zkumavce za použití tepelného bloku (4.24.2) a znovu se rozpustí v 1 ml chloroformu.

6.2. Příprava derivátů a chromatografie na tenké vrstvě

Viz metoda A v příloze směrnice Rady 76/372/EHS bod 5.6.2.

7. Výpočet výsledků

Obsah aflatoxinu B1 (µg/kg) vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$\text{aflatoxin B1 (}\mu\text{g/kg)} = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

kde:

m = množství aflatoxinu B1 v ng, vypočtené z píku aflatoxinu B1 ve vzorku vypočtené takto:

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

$P_{(vs)}$ = plocha píku aflatoxinu B1 ve vzorku

$P(st_1)$ = plocha píku aflatoxinu B1 získaná předchozím nástřikem referenčního standardu (3.13.3)

$P(st_2)$ = plocha píku aflatoxinu B1 získaná následným nástřikem referenčního standardu (3.13.3)

$r(st)$ = množství aflatoxinu B1 ve vstřiku referenčního standardu (3.13.3) v ng

V_m = objem nástřiku extraktu vzorku v mililitrech

V_k = konečný objem extraktu vzorku v mililitrech (po všech zředěních, která byla provedena podle odstavce 5.3)

M = hmotnost vzorku v gramech

V_f = objem filtrátu převedeného na patronu s Florisilem (5.4.1.2) v mililitrech

V_c = objem chloroformu použitého k extrakci vzorku v mililitrech

Pokud je dodržen postup, změní se vzorec takto:

$$\text{aflatoxin B1 (}\mu\text{g/kg)} = 20 \times m$$

7.1. Výpočty výsledků mohou být také provedeny z výšek pík.

8. Opakovatelnost

Viz odstavec 10.1.

9. Reprodukovatelnost

Viz odstavec 10.1.

10. Poznámky

10.1. Přesnost

Na mezinárodní úrovni byla provedena společná studie ⁽¹⁾ pro krmné směsi, jejíž výsledky opakovatelnosti a reprodukovatelnosti jsou uvedeny v tabulce 1. Výraz opakovatelnost (r) je zde definován jako největší poměr, který není významný na úrovni pravděpodobnosti 95 % pro porovnání dvou měřených údajů stejného vzorku v téže laboratoři a za podobných podmínek. Výraz reprodukovatelnost (R) je zde definován podobně pro porovnání dvou různých laboratoří. V souladu s normou ISO ⁽²⁾ a s rozhodnutím Komise 89/610/EHS ⁽³⁾ jsou hodnoty r a R v tabulce uváděny také v podobě variačního koeficientu.

Tabulka 1

Opakovatelnost (r) a reprodukovatelnost (R) vyjádřené jako poměr odpovídajících variačních koeficientů
(15 laboratoří)

Koncentrace	r	R	CVr (*)	CVR
(µg/kg)			(%)	(%)
8 a 14	1,4	1,7	11	18

(*) CV = variační koeficient

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

⁽²⁾ ISO 3534-1977.

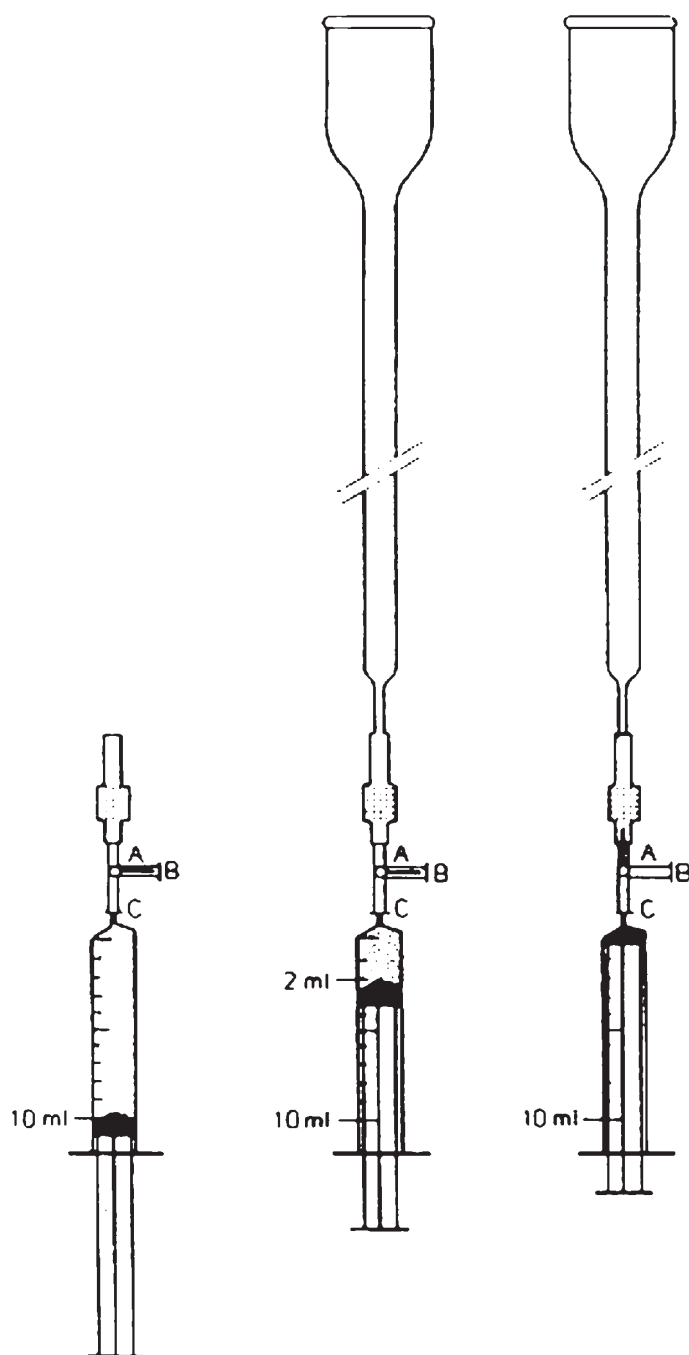
⁽³⁾ Úř. věst. L 351, 2.12. 1989, s. 39.

10.2. *Stabilizace chloroformu (3.1)*

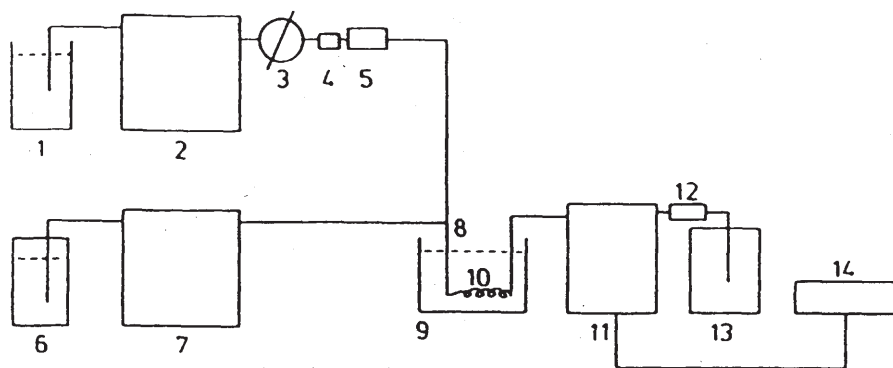
Pokud se ke stabilizaci chloroformu používá jiný stabilizátor než ethanol, může docházet ke změně adsorpční charakteristiky florisilové patrony. Pokud není popsany chloroform dostupný, musí se to ověřit v souladu s odstavcem 10.3.

10.3. *Správnost*

Správné použití metody se ověřuje opakovanými měřeními schválených referenčních materiálů. Pokud nejsou k dispozici, provedení metody se ověřuje testem výtěžnosti na fortifikovaných slepých vzorcích. Standardní odchylka od skutečné hodnoty vyjádřená v % skutečné hodnoty musí být v rozmezí -20 až +10 %.



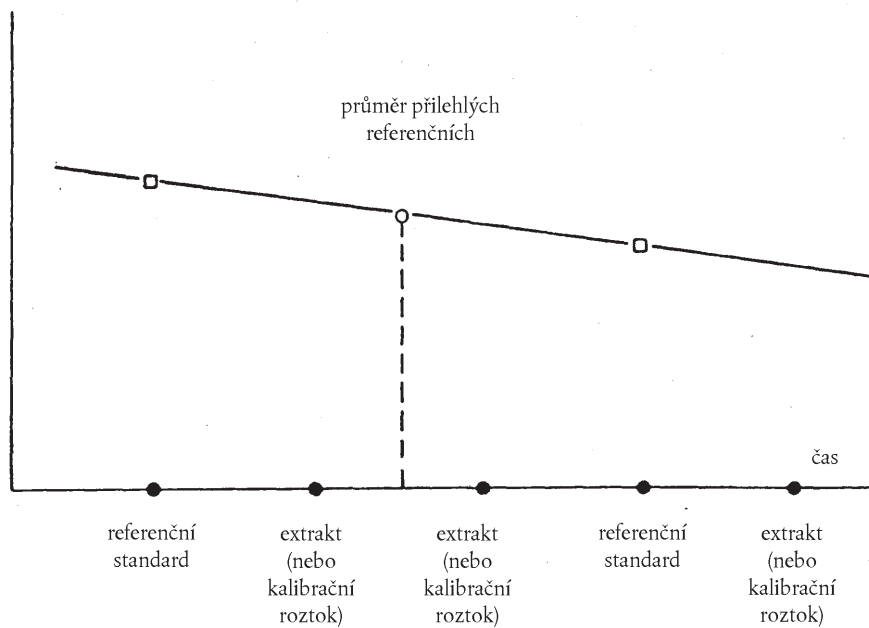
Obr. 1: Propojení kolony a patrony



- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1. Mobilní fáze | 8. T-spojka |
| 2. Čerpadlo | 9. Termostatem řízená lázeň |
| 3. Vstřikovací ventil | 10. Spirálová reakční smyčka |
| 4. Ochranná kolona | 11. Fluorescenční detektor |
| 5. Analytická kolona HPLC | 12. Restriktor |
| 6. Nasycený roztok jódu | 13. Odpad |
| 7. Čerpadlo čidla | 14. Zapisovač |

Obr. 2: Zpracovatelské schéma systému HPLC s postkolonovou derivatizací jódem

odezva



Obr. 3: Kompenzace posunu odezvy aflatoxinu B1 pravidelným nástřikem referenčního standardu (3.13.3)