

СПОРЕДБА НА ДВЕ РАЗЛИЧНИ АНАЛИТИЧКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ВКУПНИ АФЛАТОКСИНИ ВО ДОБИТОЧНА ХРАНА

Стојановска-Димзоска Билјана, Хајрулаи-Муслиу Зехра,
Димитриеска-Стојковиќ Елизабета, Енимитева Вангелица, Секуловски Павле

*Институт за храна, Факултет за Ветеринарна Медицина - Скопје,
e-mail: bsdimzoska@fvm.ukim.edu.mk*

АБСТРАКТ

Течната хроматографија со флуоресценчен детектор и флуорометријата (флуоресценчна спектрометрија) на кои им претходи процес на прочистување користејќи имуноафинитетни колони, се две аналитички методи на кои е направена споредба, со цел евалуација на нивните перформанси во определувањето на вкупни афлатоксини во добиточна храна. Извршена е валидација на аналитичките методи и утврдена е линеарност во предложениите концентрациски подрачја со задоволителни коефициенти на корелација (0,9994 односно 0,978 за двете методи). Беа определени лимитите на детекција за двете методи и тие изнесуваа 0,003 ng/ml (во просек за HPLC-FD методот) и 0,12 ng/ml за флуорометријата. Точноста на методите беше определена со користење на референтни материјали со точно определена концентрација и преку методот на стандарден додаток и иситата изнесуваа 85,82% (во просек за HPLC-FD методот) и 56,75% за флуорометријата. Двасет концентрации за јунци и 20 концентрации за свињи беа анализирани паралелно со двете методи. Добиените вредности се во корелација во однос на двете методи само во повисокото концентрациско подрачје, додека за концентрации под 1,0 µg/kg флуорометријата покажува ограничена осетливост и селективност. Со тоа се потврдува неговата ограничена употреба само како "screening" метод, а HPLC-FD методот е метод од избор на аналитичарот со цел добивање точни и сигурни резултати.

Клучни зборови: афлатоксини, добиточна храна, HPLC-FD, флуорометрија

ВОВЕД

Микотоксините се секундарни метаболити на габите и мувлите кои кога ќе се внесат во организмот на луѓето и животните преку дигестија, инхалација или апсорпција преку кожата, предизвикуваат незабележителни знаци, болест или смрт, во зависност од степенот на изложеност и концентрација (1). Микотоксиколошката контаминација на храната за луѓе и за животни во голема мера зависи од условите на надворешната средина,

- пред сè температура и влага, кои водат кон развој на мувли и продукција на токсини.
- Најверојатно ниедна храна не може да се смета за апсолутно безбедна од микотоксиколошка контаминација, бидејќи тие се присутни во сите периоди, почнувајќи од преджетвениот период (на поле), за време на жетвата, за време на складирањето или за време на транспортот, ако за тоа се создадат услови (2). Се претпоставува дека дури 25 до 40% од житариците во светот се контаминирани со микотоксини (3). Видовите

на габи од родот *Fusarium*, *Penicillium* и *Aspergillus*, како најчести контаминенти на житариците, создаваат цел низ на микотоксини меѓу кои афлатоксините заземаат значајно место со оглед на негативните последици врз здравјето на луѓето и животните како и штетата во земјоделското и животинско производство поради кумулацијата во нивните производи (месо, јајца, млеко) (4).

Афлатоксините ги произведуваат некои соеви на *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. До сега се идентификувани четири примарни афлатоксини и тоа AFB₁, AFB₂, AFG₁ и AFG₂. Оптималната температура за појава на афлатоксини е меѓу 25°C и 32°C како и релативна влажност над 85% (5). Имајќи го во предвид фактот дека афлатоксинот B₁ е потентен карциноген (со целно место на делување во црниот дроб), во 1988 година, Интернационалната Агенција за Истражување на Ракот (International Agency for Research on Cancer – IARC), го стави овој афлатоксин на листата на хумани карциногени (6). Со европската регулатива EC No 100/2003 одредени се максимално дозволените граници за најтоксичниот AFB₁ микотоксин во добиточна храна (7). Во нашата земја важечки е правилникот кој го регулира начинот на вршење на ветеринарно-санитарна контрола на добиточна храна (8) во кој се дадени максимално дозволените граници за поедини микотоксини во различни видови на житарици и добиточна храна.

Најголем дел од досегашните истражувања во областа на аналитиката на микотоксините кај нас се насочени кон примена на т.н. брзи ("screening"), квалитативни или полуквантитативни тестови (флуорометриско определување). Со оглед на фактот дека микотоксините се присутни во многу мали количини, истите имаат хетерогена распределба, а комплексен е и матриксот во кој се присутни, разбирлива е употребата на осетливи, прецизни и точни аналитички техники, кои ќе успеат да го детектираат и квантифицираат присуството на микотоксините. Течната хроматографија под висок притисок со флуоресцентен детектор (HPLC-FD) (9), е најчесто користен аналитички метод за детекција и квантификација на микотоксини кој во себе вклучува претходно прочистување на примероците преку строго селективни и специфични, имуноафинитетни колони (10).

Целта на ова истражување беше да се направи споредба на две аналитички методи за определување на вкупни афлатоксини во добиточната храна која се користи во исхраната на животните во Република Македонија (РМ). Интересот за оваа проблематика кај нас е сè поголем, особено заради можноста за мониторинг на житариците и добиточната храна во РМ, како од домашно (сопствено) производство, така и од увоз со што би се добила вистинска слика за микотоксиколошката контаминација на овие продукти и подобар увид во нивната безбедност и сигурност. На тој начин, во иднина, би се контролирало и здравјето на животните, а со тоа индиректно и здравјето на луѓето во непрекинатиот синџир на исхрана.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

● Хемикалии и материјали

Растворувачите со HPLC чистота (метанол, ацетонитрил, вода) и р.а. хемикалиите (бензен, NaCl) беа набавени од производителот Merck (Darmstadt, Germany). Во постапката на прочистување на примероците беа користени имуноафинитетните Aflaprep® колони (R-Biopharm Rhône LTD).

Стандардот на вкупни афлатоксини беше набавен од Supelco (Aflatoxins mix (B₁ 982 ng/ml, B₂ 284 ng/ml, G₁ 1034 ng/ml, G₂ 333 ng/ml) растворен во бензен: ацетонитрил (98:2)). Основниот стандарден раствор на мешавина од афлатоксини со концентрација (B₁ 100 ng/ml, B₂ 28,4 ng/ml, G₁ 103,4 ng/ml, G₂ 33,3 ng/ml) е подготвен со растворање на аликвот од стандардот на вкупни афлатоксини во одмерна, темна тиквичка од 10 ml. Од основниот стандарден раствор се припремаат седум работни стандардни раствори на афлатоксините во соодветни темни, волуметриски садови од 5 ml. Аликвотот од потребниот волумен за припрема на растворот се упарува под струја од азот, а сувиот остаток се раствора со раствор на метанол и вода (1:1). Сите работни раствори се чувани на температура од +2 до +8°C. Двата работни раствори кои беа користени за флуорометриско определување на афлатоксините беа со концентрација од 22 ng/ml и -1 ng/ml, како и еден калибрационен

стандард кој служи за проверка и е со концентрација меѓу двете гранични вредности (11).

● Инструменти

Беше користен Perkin Elmer (PE) HPLC систем опремен со бинарна пумпа (PE LC-250), мануелен инјектор (тип PE Rheodyne 7125) и флуоресцентен детектор (PE LC-240). Хроматографското разделување беше направено на собна температура на Supelco колона (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), врзана за заштитна (Supelcguard™ LC-18, 2 cm cartridge) колона. Мобилната фаза беше смеса на вода:ацетонитрил:метанол во однос (600:350:50, V/V/V), на која и беше додадено 119 mg KBr и 350 μ l 4N HNO₃. Претходно мобилната фаза беше дегазирана во ултразвучно купатило. Протокот беше поставен на 1,0 ml/min, а волуменот на инјектирање беше 100 μ l. Брановите должини на апсорпција и емисија беа 360 и 440 nm, соодветно.

За флуорометриска анализа беше користен флуорометар од фирмата Viscam (USA). Пред да се изврши флуорометриското определување, потребна е проверка на чистотата на хемикалиите, односно дали 1 ml вода дава вредност нула за флуоресценција (слепа проба) и дали 1 ml развивач за афлатоксини исто така дава вредност нула за отчитаната флуоресценција.

● Подготовка на примероците

Подготовката на примероците беше во согласност со препораките на производителот (11), кој во исто време претставува и AOAC метод. Како дополнително за HPLC-FD методот беше искористен и ISO 16050 стандардот, кој се однесува на определување на вкупни афлатоксини во житарици (12). На вага се одмеруваат 25 g примерок (добиточна храна) и 5 g сол (NaCl). Се ставаат во челичен блендер и се додава 125 ml екстракционно средство (метанол:вода 70:30). Се миксира на најголема брзина 2 минути. Екстрактот од блендерот се филтрира преку набрана филтер хартија и се пренесува во чист сад. Се одмеруваат 15 ml од екстрактот и се разредуваат со 30 ml пречистена вода. Се меша добро. Разредениот екстракт се филтрира преку микрофибер хартија до 15 ml. Филтрираниот екстракт

комплетно минува низ имуноафинитетната колона со брзина од 1-2 капки/секунда, се додека не излезе воздухот од колоната. Следи постапка на миење на колоната со 10 ml прочистена вода со брзина на проток од 2 капки/секунда. Елуирањето се врши со 1 ml метанол (HPLC чистота) и елуатот се собира во чиста епрувета. Ако се врши флуорометриски определување на вкупните афлатоксини, на елуатот се додава уште 1 ml девелопер и резултатот се чита на калибриран флуорометар по 60 секунди. Ако се врши определување на микотоксините со HPLC-FD, на елуатот му се додава 1 ml прочистена вода. Добро се меша и се инјектира 100 μ l во HPLC системот.

● Примероци добиточна храна

Како примероци добиточна храна во овој труд, беа користени 20 концентрати за јунци и 20 концентрати за свињи. Сите примероци беа анализирани паралелно со двете аналитички методи. Како референтен материјал за контрола на HPLC-FD методот, како и за определување на аналитичкиот принос, беа користени два производи од житарици со точно определена концентрација на афлатоксин B₁ од 16,37 μ g/kg \pm 3,40 односно 6,80 μ g/kg 1,96, со ознаки C и D, набавени од производителот Associazione Italiana Allevatori (A.I.A), Italia.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

● Валидација на HPLC-FD методот

Квантификацијата на вкупните афлатоксини во примероците на добиточна храна беше изведена со користење на седум работни стандардни раствори. Калибрационата крива беше линерна во предложеното концентрациско подрачје: за AFB₁ (0,25–15,0 ng/ml), коефициентот на корелација изнесуваше 0,9981; за AFB₂ (0,071–4,26 ng/ml) коефициентот на корелација изнесуваше 0,9998; за AFG₁ (0,258–15,51 ng/ml) коефициентот на корелација изнесуваше 0,9999 и за AFG₂ (0,083–4,99 ng/ml) коефициентот на корелација изнесуваше 0,9999.

Лимитот на детекција (LOD) изнесуваше 0,002 ng/ml за AFB₁ и AFB₂, односно 0,004 ng/ml за AFG₁ и AFG₂ и истиот беше пресметан

математички преку равенката $3,3 \times SD / \text{наклон}$, каде наклонот е пресметан од калибрационата крива во пониското концентрациско подрачје, а SD претставува стандардна девијација добиена со пресметка на аналитичкиот одговор од десет слепи проби. Лимитот на квантификација (LOQ) изнесуваше 0,006 ng/ml за AFB₁ и AFB₂, односно 0,011 ng/ml за AFG₁ и 0,013 ng/ml за AFG₂. Се пресметува математички преку равенката $10 \times SD / \text{наклон}$, на ист начин како и пресметката за LOD.

Точноста на методот беше определена преку аналитичкиот принос. За таа цел беа користени двата референтни материјали, како и примероци на пченка кои во претходните анализи не покажале присуство на афлатоксини. Беше применет метод на стандарден додаток. Пресметаниот аналитички принос е задоволителен и се движи во граници од 49,63-125,65%, за сите афлатоксини поединечно, односно во просек за вкупни афлатоксини, аналитичкиот принос изнесува 85,82%.

Прецизноста на системот, беше определена преку анализа на шест серии од седумте калибрациони раствори на четирите афлатоксини. Резултатите се прикажани во Табелите 1а до 1г.

Табели 1а-1г. Податоци за прецизноста на HPLC системот за сите AFB₁, AFB₂, AFG₁ и AFG₂ афлатоксини поединечно

1-а. Прецизност на HPLC системот за AFB₁

	AFB ₁ конц. (ng/ml) на калибрационите раствори						
	0,25	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0	15,0
	определена AFB ₁ конц. (ng/ml)						
\bar{x}	0,36	0,56	1,06	2,74	4,91	9,98	15,13
SD*	0,01	0,02	0,02	0,08	0,07	0,23	0,26
RSD (%)	3,99	3,53	1,97	3,01	1,43	2,35	1,72

*n = 6

1-б. Прецизност на HPLC системот за AFB₂

	AFB ₂ конц. (ng/ml) на калибрационите раствори						
	0,071	0,142	0,284	0,71	1,42	2,84	4,26
	определена AFB ₂ конц. (ng/ml)						
\bar{x}	0,11	0,18	0,373	1,03	1,98	3,99	5,96
SD*	0,01	0,01	0,01	0,02	0,08	0,10	0,18
RSD (%)	5,85	6,00	3,66	1,71	3,80	2,57	3,07

*n = 6

1-в. Прецизност на HPLC системот за AFG₁

	AFG ₁ конц. (ng/ml) на калибрационите раствори						
	0,258	0,517	1,034	2,58	5,17	10,34	15,51
	определена AFG ₁ конц. (ng/ml)						
\bar{x}	0,267	0,47	0,99	2,70	5,12	10,31	15,52
SD*	0,01	0,03	0,02	0,05	0,1	0,28	0,25
RSD (%)	7,28	5,48	2,12	1,88	2,00	2,73	1,59

*n = 6

1-г. Прецизност на HPLC системот за AFG₂

	AFG ₂ конц. (ng/ml) на калибрационите раствори						
	0,083	0,166	0,333	0,832	1,66	3,33	4,99
	определена AFG ₂ конц. (ng/ml)						
\bar{x}	0,11	0,155	0,30	0,83	1,66	3,35	4,97
SD*	0,1	0,01	0,01	0,04	0,03	0,07	0,11
RSD (%)	5,65	7,61	3,04	4,70	1,78	2,02	2,18

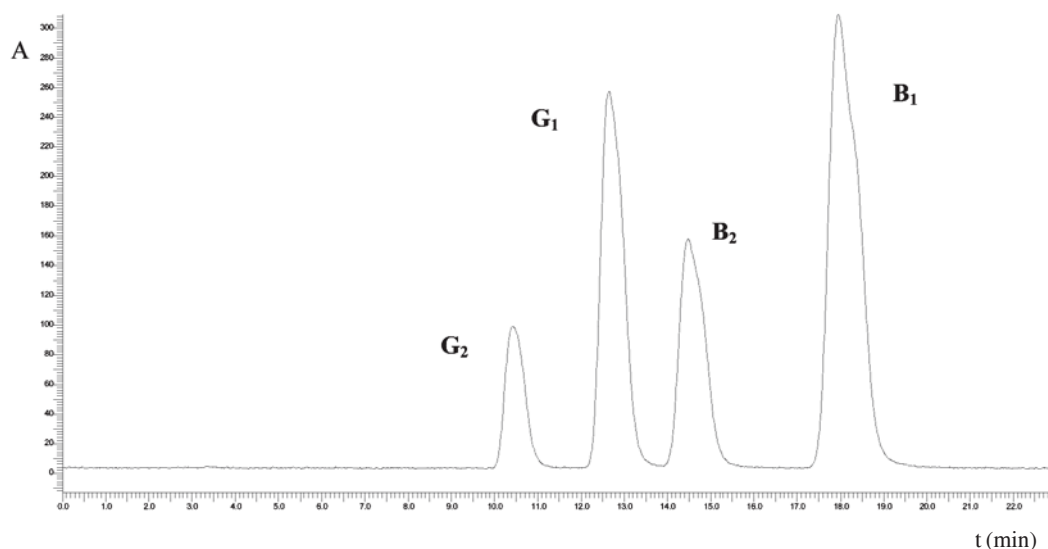
*n = 6

Може да се забележи дека вредноста за RSD се движи во граници од 1,43 до 7,61%, што укажува на добра и задоволителна повторливост на системот.

Добиените хроматограми се чисти, со рамна базна линија, практично без нечистотии, неидентификувани пикови и други интерферирачки, флуоресцентни супстанции (Слика 1). Сето ова е резултат на високата селективност и специфичност на имуноафинитетните колони.

содржината на вкупни афлатоксини, а не поединечно како што се врши определувањето на афлатоксините со HPLC-FD методот. Методот се покажа како задоволително линеарен, со коефициент на корелација 0,978.

Лимитот на детекција (LOD), според препораките на производителот, е дефиниран како: $LOD = \text{средна вредност} + 3 \text{ SD}$. Средната вредност се однесува на прочитан HPLC сигнал од десет примероци добиточна храна



Слика 1. HPLC-FD хроматограм на четирите афлатоксини (B_1 , B_2 , G_1 и G_2)

● Валидација на флуорометрискиот метод

Валидацијата на флуорометрискиот метод беше направена во согласност со препораките на производителот (11). Концентрациското подрачје на мерење беше определено со користење на шест примероци добиточна храна кои во претходните анализи не покажале присуство на афлатоксини во себе (определени со HPLC-FD метод) и на истите им беше додаден стандарден додаток во концентрација од 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 и 15,0 ng/ml соодветно.

Линеарноста на методот беше утврдена преку конструирање на калибрациона крива дадена како однос меѓу очекуваните (теоретски) и измерените концентрации. Треба да се напомене дека со флуорометриската анализа може да се утврди само

кои во претходните анализи не покажале присуство на афлатоксини во себе, а SD е стандардната девијација од тие десет прочитани сигнали. Добиениот LOD беше многу повисок во споредба со оној добиен со примена на HPLC-FD методот и изнесуваше 0,12 ng/ml.

За пресметка на аналитичкиот принос, како мерка за точноста на методот, беа користени истите референтни материјали и примероци на пченка кои во претходните анализи не покажале присуство на афлатоксини, применувајќи метод на стандарден додаток. Аналитичкиот принос изнесуваше 56,75% за вкупни афлатоксини, што е нешто понизок во споредба со добиениот аналитички принос кога беше применет HPLC-FD методот.

● **Споредба на HPLC-FD и флуорометрискиот метод**

Во текот на ова истражување беа користени дваесет концентрати за јунци и дваесет концентрати за свињи. Сите примероци беа работени паралелно со двете методи со цел споредба помеѓу нив. Добиените резултати се прикажани во Табела 5.

Четири концентрати за свињи (20%) покажаа присуство на афлатоксини (пред сè AFB_1) во граници од 0,45 до 3,56 $\mu\text{g/kg}$. Ако повторно се погледне табелата, може да се донесе истиот заклучок и кога станува збор за концентратите за јунци. Имено, добиените вредности при примена на флуорометрискиот метод се во корелација со оние вредности добиени при примена на HPLC-FD методот, само при повисоките концентрации, што е

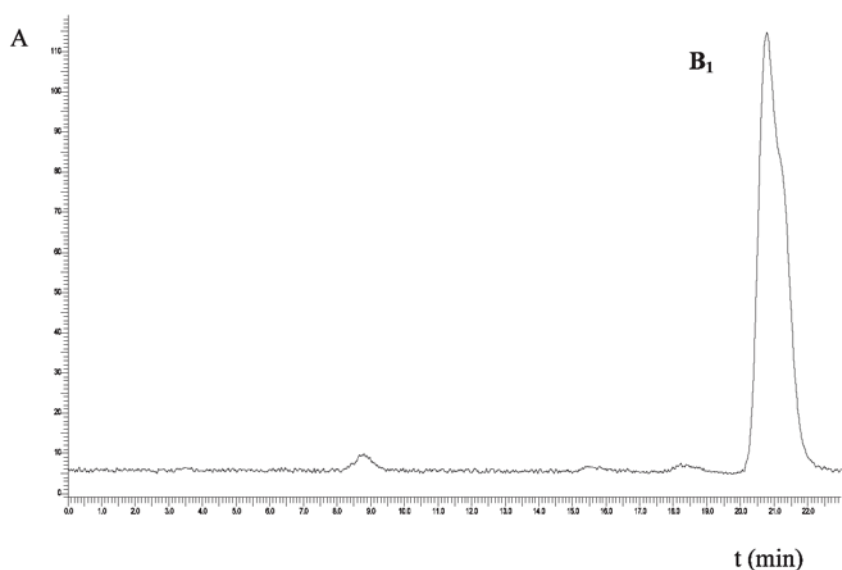
Табела 5. Споредба на присуството на вкупни афлатоксини во добиточна храна со HPLC-FD и флуорометриски метод

примероци на добиточна храна	концентрација на вкупни афлатоксини определени со HPLC-FD метод	концентрација на вкупни афлатоксини определени со флуорометриски метод
концентрат за јунци 1	0,36 $\mu\text{g/kg}$	0,0 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за јунци 4	0,59 $\mu\text{g/kg}$	0,0 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за јунци 5	0,976 $\mu\text{g/kg}$	1,0 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за јунци 12	1,56 $\mu\text{g/kg}$	1,7 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за јунци 17	3,75 $\mu\text{g/kg}$	3,8 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за јунци 19	4,58 $\mu\text{g/kg}$	4,7 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за свињи 2	0,45 $\mu\text{g/kg}$	0,0 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за свињи 8	0,78 $\mu\text{g/kg}$	0,0 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за свињи 11	2,83 $\mu\text{g/kg}$	2,8 $\mu\text{g/kg}$
концентрат за свињи 13	3,56 $\mu\text{g/kg}$	3,7 $\mu\text{g/kg}$

Шест концентрати за јунци (30%) покажаа присуство на афлатоксини (пред сè AFB_1) во граници од 0,36 до 4,58 $\mu\text{g/kg}$, а останатите концентрати се со вредност за афлатоксини под лимитот на детекција. Како што може да се види од табелата, добиените вредности при примена на флуорометрискиот метод се во корелација со оние вредности добиени со примена на HPLC-FD методот, посебно кога станува збор за вредности повисоки од 1,0 $\mu\text{g/kg}$. Но за вредности пониски од 1,0 $\mu\text{g/kg}$ очигледно е дека осетливоста и селективноста на флуорометрискиот метод е помала, што е доказ за неговата ограничена примена само како "screening" метод.

уште еден показател за ограничената осетливост и селективност на флуорометрискиот метод.

На слика 2 даден е хроматограмот на концентрат за јунци со концентрација за афлатоксин B_1 од 4,58 $\mu\text{g/kg}$. Од сликата може да се забележи добро хроматографско разделување на пикот, рамна базна линија и мали нечистотии од матриксот кои не влијаат на крајниот резултат. Сето ова е уште еден доказ за високата селективност и специфичност на употребените имуноафинитетни колони за пречистување на примероците, како и примената на високо селективен HPLC-FD метод за квантификација на афлатоксините.



Слика 2. HPLC-FD хроматограм на примерок концентрат за јунци

ЗАКЛУЧОК

Нема сомнение дека HPLC-FD методот претставува точен, осетлив и селективен метод, кој обезбедува високи вредности за аналитичкиот принос во пошироко концентрациско подрачје, со прифатливи вредности за прецизност на методот. Од друга страна, за негова изведба е потребно подолго време, се работи со скапи инструменти, а во исто време потребна е и посебна обука за нивно користење.

Како што може да се види од резултатите, флуорометријата не претставува точен и строго селективен метод за квантитативно определување на афлатоксините во добиточната храна. Од друга страна пак, тој е едноставен и брз метод за кој не се потребни

· дополнителни аналитички способности и
· економски е оправдан во споредба со HPLC-FD методот. Се одликува со задоволителна
· линеарност во предложеното концентрациско
· подрачје, но со понизок аналитички принос и
· висок лимит на детекција. Посебно треба да
· се истакне неговата ограничена осетливост
· и селективност при пониски концентрации.
· Затоа флуорометрискиот метод може да се
· користи само како "screening" метод во
· рутинските анализи посебно во лаборатории
· кои секојдневно се соочуваат со голем број
· на примероци за анализа. Но, со цел добивање
· на точни и сигурни резултати, HPLC-FD
· методот треба да биде метод од избор на
· аналитичарот при определување на афлато-
· ксините во добиточната храна.

COMPARISON OF TWO DIFFERENT ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF AFLATOXINS IN FEED

Stojanovska-Dimzoska Biljana, Hajrulai-Musliu Zehra,
Dimitrieska-Stojkovic Elizabeta, Enimiteva Vangelica, Sekulovski Pavle

Food Institute, Faculty of Veterinary Medicine-Skopje

e-mail: bsdimzoska@fvm.ukim.edu.mk

ABSTRACT

Liquid chromatography - fluorescence detector and fluorometry (fluorescence spectrometry) with previous immunoaffinity column clean-up, are two methods that are compared in order to evaluate their performances in determination of total aflatoxins content in feed. Method validation was established, linearity of the methods was checked, and a good coefficient of correlation was found for bought methods (0,9994 and 0,978 respectively). The limits of detection were 0,003 ng/ml (average for HPLC-FD method) and 0,12 ng/ml for fluorometry. The accuracy of the methods was determined using reference materials with known concentration and spiked aflatoxins free samples. The recoveries were found to be 85,82% (average for HPLC-FD method) and 56,75%, for fluorometry. Twenty feed concentrates for bullock and 20 feed concentrates for swine, were analyzed parallel with bought methods. The results are in correlation only in higher concentration range. For lower concentration range (below 1,0 µg/kg) fluorometry shows limited sensitivity and selectivity. It was found that it is applicable only as a screening method for the prediction of aflatoxins. HPLC-FD method remains a method of choice for the analyst in order to achieved accurate and reliable results.

Key words: aflatoxins, feed, HPLC-FD, fluorometry

ЛИТЕРАТУРА

- | | | |
|--|---|---|
| 1. Pitt J I. (1996); What are mycotoxins? Australian Mycotoxin Newsletter. 7(4). p.1. | · | Council on undesirable substances in animal feed. |
| 2. Edmond E. Creppy. (2002); Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters 127, p.19-28. | · | |
| 3. Mašek T., Šerman V. (2006) The influence of mycotoxins on ruminant health and performance. Krmiva 48,Zagreb 1; p.19-31. | · | |
| 4. Pepeljnjak S, Cvetnic Z, Šegvic Klaric M. (2008) Ochratoxin A and Zearalenon: Cereals and feed contamination in Croatia (1977-2007) and influence on animal and human health. Krmiva 50 Zagreb1; p.147-159. | · | |
| 5. Herrman T. (2002): Mycotoxins in feed grains and ingredients. Kansas State University. | · | |
| 6. IARC (1999): Overall evaluations of carcinogenicity to humans. IARC Monographs. Vol 1-73:1-36. | · | |
| 7. Commission Regulation (EC) No. 100/2003 of October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and the | · | |
| 8. Службен весник на Република Македонија бр. 20/2005, Правилник за начинот на вршење на ветеринарно-санитарна контрола на добиточната храна. | · | |
| 9. Scott P.M., Trucksess, M. (1997) Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. J of AOAC International Vol. 80, No.5. | · | |
| 10. Dunne C., Meancy M., Smyth M. (1993) Multimycotoxin detection and clean-up method for aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in animal feed ingredients using high-performance liquid chromatography and gel permeation chromatography. Journal of Chromatography, 629; p:229-235. | · | |
| 11. AflaTest Instrustion Manual (1999), Vicam, USA | · | |
| 12. Foodstuffs – Determination of aflatoxin B ₁ and the total content of aflatoxins B ₁ , B ₂ , G ₁ and G ₂ in cereals, nuts and derived products – High performance liquid chromatographic method, ISO 16050:2003(E). | · | |