

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10638:2014**

**EN 14123:2003**

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN B<sub>1</sub>  
VÀ TỔNG AFLATOXIN B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> TRONG LẠC, QUẢ HỒ  
TRẦN, QUẢ VỎ VÀ BỘT ỚT – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ  
LỎNG HIỆU NĂNG CAO CÓ TẠO DẪN XUẤT SAU CỘT VÀ  
LÀM SẠCH BẰNG CỘT ÁI LỰC MIỄN NHIỄM**

*Foodstuffs – Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, and the sum of  
aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in peanuts, pistachios, figs, and paprika powder –  
High performance liquid chromatographic method with post-column derivatization  
and immunoaffinity column clean-up*

HÀ NỘI - 2014

## Lời nói đầu

TCVN 10638:2014 hoàn toàn tương đương với EN 14123:2003;

TCVN10638:2014 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13  
*Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn  
Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thực phẩm - Xác định hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> và tổng aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> trong lạc, quả hồ trăn, quả vả và bột ớt - Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao có tạo dẫn xuất sau cột và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm

*Foodstuffs – Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> and the sum of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in peanuts, pistachios, figs, and paprika powder – High performance liquid chromatographic method with post-column derivatization and immunoaffinity column clean-up*

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng để xác định các aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub> trong quả vả, quả hồ trăn, quả lạc và bột ớt. Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,8 ng/g đối với từng loại aflatoxin hoặc tốt hơn (các giá trị nhận được từ nghiên cứu liên phòng và nội phòng thí nghiệm), tùy thuộc vào thiết bị sử dụng.

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

### 3 Nguyên tắc

Phản mẫu thử được chiết bằng dung môi (metanol/nước) hoặc dung môi có thêm hexan (hoặc cyclohexan). Dịch chiết mẫu được lọc, pha loãng với dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) rồi đưa lên cột ái lực miễn nhiễm (IAC) chứa các kháng thể đặc hiệu đối với từng loại aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub>. Các aflatoxin được rửa giải ra khỏi cột ái lực miễn nhiễm bằng metanol. Định lượng các aflatoxin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) có tạo dẫn xuất sau cột (PCD) bằng brom hóa sau đó bằng detector huỳnh quang. Cũng có thể tạo dẫn xuất sau cột bằng brom được tổng hợp bằng phương pháp điện hóa hoặc bằng pyridini hydrobromua perbromua (PBPB).

### 4 Thuốc thử

#### 4.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước loại 3 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) trừ khi có quy định khác.

#### 4.2 Dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS)

Hòa tan 0,20 g kali clorua, 0,20 g kali dihydro phosphat, 1,16 g dinatri hydro ortophosphat (hoặc 2,92 g hydrophosphat ngậm 12 phân tử H<sub>2</sub>O) và 8,00 g natri clorua trong 0,9 lít nước. Sau khi hòa tan, chỉnh pH đến 7,4 bằng HCl (0,1 mol/l) hoặc NaOH (0,1 mol/l) một cách thích hợp. Thêm nước đến 1 lít.

Có thể sử dụng các viên muối đệm phosphat có bán sẵn trên thị trường có các đặc tính tương tự.

#### 4.3 Natri clorua.

#### 4.4 Pyridini hydrobromua perbromua (PBPB), [CAS:39416-48-3].

#### 4.5 Kali bromua.

#### 4.6 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

#### 4.7 Metanol, loại dùng cho HPLC.

#### 4.8 Metanol, loại kỹ thuật.

#### 4.9 Toluên.

#### 4.10 Hỗn hợp dung môi metanol và nước

Trộn 8 thể tích metanol (4.8) với 2 thể tích nước.

#### 4.11 n-Hexan, cyclohexan, loại kỹ thuật.

#### 4.12 Axit nitric, c(HNO<sub>3</sub>) = 4 mol/l.

#### 4.13 Cột ái lực miễn nhiễm

Cột ái lực chứa các kháng thể có thể hấp thu các aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub>. Cột có khả năng tách tối đa không nhỏ hơn 100 ng và có độ thu hồi không nhỏ hơn 80 % đối với các aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và không nhỏ hơn 60 % đối với aflatoxin G<sub>2</sub> khi sử dụng dung dịch chuẩn nước (10 % metanol) chứa 5 ng mỗi loại độc tố. Nồng độ dung môi tối đa của các dung dịch đưa lên cột không được quá 12 % metanol.

#### 4.14 Dung môi pha động HPLC (A), sử dụng với PBPB

Trộn 6 thể tích nước với 2 thể tích axetonitril (4.6) và 3 thể tích metanol (4.7). Khử khí của dung dịch trước khi sử dụng. Pha động không được chứa hạt và phải được lọc trước khi sử dụng.

#### 4.15 Dung môi pha động HPLC (B), sử dụng với brom được tổng hợp bằng phương pháp điện hóa

Trộn 6 thể tích nước với 2 thể tích axetonitril (4.6) và 3 thể tích metanol (4.7). Thêm 120 mg kali bromua (4.5) và 350 µl axit nitric (4.12) trên lit pha động. Khử khí của dung dịch trước khi sử dụng.

#### 4.16 Thuốc thử sau cột

Hòa tan 50 mg PBPB (4.4) trong 1 lit nước. Dung dịch này có thể sử dụng trong 4 ngày nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng để ở nơi tối.

#### 4.17 Hỗn hợp toluen và axetonitril

Trộn 98 thể tích toluen (4.9) với 2 thể tích axetonitril (4.6).

4.18 Aflatoxin, dạng tinh thể hoặc dạng màng mỏng trong ampun hoặc ở dạng dung dịch aflatoxin bán sẵn trên thị trường.

**CẢNH BÁO 1** – Các quy trình khử nhiễm đối với chất thải aflatoxin phòng thử nghiệm do Cơ quan nghiên cứu quốc tế về ung thư (IRAC) [1], [2] xây dựng.

**CẢNH BÁO 2** – Các aflatoxin dễ bị phân hủy bởi ánh sáng. Nơi phân tích aflatoxin trong phòng thử nghiệm phải tránh ánh sáng ban ngày. Có thể sử dụng màng mỏng hấp thụ tia cực tím (UV) để che các cửa sổ kết hợp với ánh sáng dịu (không phải ánh sáng trực tiếp mặt trời) hoặc dùng rèm cửa hoặc màn che kết hợp với ánh sáng nhân tạo (có thể sử dụng đèn ống huỳnh quang).

Bảo vệ các dung dịch chứa aflatoxin càng tránh ánh sáng càng tốt (giữ ở nơi tối, sử dụng màng nhôm hoặc thủy tinh màu hổ phách) và bảo quản ở nhiệt độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất (ví dụ - 18 °C).

#### 4.19 Dung dịch gốc aflatoxin

Hòa tan từng aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub> trong hỗn hợp toluen và axetonitril (4.17) để thu được các dung dịch có nồng độ 10 µg/ml đối với từng loại aflatoxin. Bọc các bình kín trong màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C.

## TCVN 10638:2014

Để xác định nồng độ chính xác các aflatoxin trong từng dung dịch gốc, ghi lại đường hấp thụ của các dung dịch ở bước sóng từ 330 nm đến 370 nm trong cuvet thủy tinh thạch anh 1 cm của máy đo phổ, dùng hỗn hợp toluen và axetonitril (4.17) trong cuvet so sánh. Tính nồng độ khối lượng của từng aflatoxin,  $\rho_i$ , bằng microgam trên mililit, sử dụng công thức (1):

$$\rho_i = \frac{A_{\max} \times M_i \times 100}{\epsilon_i \times d} \quad (1)$$

Trong đó:

$A_{\max}$  là độ hấp thụ xác định được ở điểm hấp thụ cực đại trên đường hấp thụ;

$M_i$  là khối lượng phân tử của từng aflatoxin, tính bằng gam trên mol (g/mol);

$\epsilon_i$  là khả năng hấp thụ phân tử của từng aflatoxin trong hỗn hợp của toluen và axetonitril (4.17), tính bằng mét vuông trên mol ( $m^2/mol$ );

$d$  là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng xentimet (cm).

$M_i$  và  $\epsilon_i$  của aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub> được nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Khối lượng phân tử và độ hấp thụ phân tử của các aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub>**

[trong hỗn hợp của toluen và axetonitril (4.17)]

Aflatoxin	$M_i$ (g/mol)	$\epsilon_i$ ( $m^2/mol$ )
B <sub>1</sub>	312	1930
B <sub>2</sub>	314	2040
G <sub>1</sub>	328	1660
G <sub>2</sub>	330	1790

### 4.20 Dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp

Chuẩn bị dung dịch gốc các aflatoxin hỗn hợp chứa nồng độ aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub> 1.000 ng/ml, aflatoxin B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub> 200 ng/ml trong hỗn hợp của toluen và axetonitril (4.17) bằng cách pha loãng các dung dịch gốc aflatoxin (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub>) (4.19).

Dùng pipet lấy chính xác 2,0 ml dung dịch này cho vào bình định mức 20 ml (5.10) đã hiệu chuẩn, thêm hỗn hợp toluen và axetonitril (4.17) đến vạch, trộn kỹ để thu được dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp đã pha loãng chứa nồng độ aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub> 100 ng/ml, aflatoxin B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub> 20 ng/ml.

Bọc kín bình trong màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C. Trước khi sử dụng, không mở bình cho đến khi lượng chứa trong bình đạt đến nhiệt độ phòng để tránh hấp thụ nước do ngưng tụ.

#### 4.21 Dung dịch chuẩn aflatoxin hỗn hợp

Dùng pipet lấy các thể tích nêu trong Bảng 2 dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp đã pha loãng chứa 100 ng/ml aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub>, 20 ng/ml aflatoxin B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub> (xem 4.20) cho vào một dãy các bình định mức 10 ml (5.10). Làm bay hơi dung dịch toluen/axetonitril đến khô bằng dòng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Thêm 4 ml metanol vào từng bình để các aflatoxin hòa tan, thêm nước đến 10 ml và lắc kỹ.

Khi trộn metanol và nước dễ bị ngót thể tích, vì vậy điều chỉnh lại thể tích đến thể tích quy định.

**Bảng 2 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn aflatoxin hỗn hợp**

Dung dịch chuẩn	Lấy từ dung dịch gốc đã pha loãng (4.20) (μl)	Nồng độ khối lượng của dung dịch chuẩn (ng/ml)			
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
1	40	0,400	0,080	0,400	0,080
2	120	1,200	0,240	1,200	0,240
3	200	2,000	0,400	2,000	0,400
4	280	2,800	0,560	2,800	0,560
5	360	3,600	0,720	3,600	0,720

#### 4.22 Dung dịch thêm chuẩn

Chuẩn bị dung dịch thêm chuẩn bằng cách dùng pipet lấy 2 ml dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp (chứa nồng độ aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub> 1000 ng/ml, aflatoxin B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub> 200 ng/ml, xem 4.20) cho vào bình định mức 10 ml đã hiệu chuẩn. Làm bay hơi dung dịch toluen/axetonitril đến khô bằng dòng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Thêm metanol đến vạch và trộn kỹ. Nồng độ của dung dịch thêm chuẩn là: aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub> 200 ng/ml, aflatoxin B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub> 40 ng/ml.

Bọc kín bình trong màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C. Trước khi sử dụng, không mở bình cho đến khi lượng chứa trong bình đạt đến nhiệt độ phòng để tránh hấp thụ nước do ngưng tụ.

### 5 Thiết bị, dụng cụ

#### 5.1 Yêu cầu chung

Tất cả các dụng cụ thủy tinh tiếp xúc với các dung dịch aflatoxin phải được rửa sạch bằng dung dịch axit trước khi sử dụng. Có nhiều máy rửa phòng thí nghiệm có cài đặt chương trình này. Nếu không, ngâm dụng cụ thủy tinh trong axit sulfuric (2 mol/l) trong một thời gian (ví dụ: 15 h qua đêm), sau đó rửa sạch (ví dụ: ba lần) với nước để loại bỏ hết axit. Kiểm tra bằng giấy pH để chắc chắn đã hết axit.

## TCVN 10638:2014

Việc xử lý này là cần thiết, vì khi sử dụng các dụng cụ thủy tinh không được rửa bằng axit có thể gây thất thoát aflatoxin, cụ thể với các bình cầu đáy tròn, bình định mức, ống đong, lọ hoặc ống nghiệm được sử dụng cho các dung dịch hiệu chuẩn và các dịch chiết cuối cùng (đặc biệt là lọ lấy mẫu tự động) và pipet Pasteur, được dùng để chuyển các dung dịch hiệu chuẩn hoặc dịch chiết.

**5.2 Các thiết bị phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:**

### 5.3 Máy nghiền phòng thử nghiệm

Hoặc máy nghiền tốc độ cao chống cháy nổ, để tạo và chiết hồ nhào từ lạc, quả hồ trăn và quả vò, có bình trộn thích hợp.

**5.4 Máy lắc ngang hoặc máy lắc đứng có thể điều chỉnh được, để phân tích bột ớt.**

**5.5 Giấy lọc gấp nếp, ví dụ đường kính 24 cm.**

**5.6 Bình nón, có nắp thủy tinh hoặc nắp vụn.**

**5.7 Giấy lọc thủy tinh mịn, giữ được cỡ hạt 1,6  $\mu\text{m}$  hoặc nhỏ hơn.**

**5.8 Bầu chứa, dung tích 75 ml có đầu nối với cột ái lực miễn nhiễm (IAC).**

**5.9 Bơm tay, dạng xyranh 20 ml có khóa hoặc nắp cao su dùng cho cột ái lực miễn nhiễm (IAC).**

**5.10 Bình định mức thủy tinh, ví dụ các bình dung tích 5 ml, 10 ml và 20 ml, có độ chính xác ít nhất là 0,5 %.**

**5.11 Hệ thống HPLC, gồm có:**

**5.11.1 Bơm HPLC, thích hợp với tốc độ dòng là 1,0 ml/min.**

**5.11.2 Hệ thống bơm, có thể bơm một vòng đầy. Nên dùng vòng bơm 200  $\mu\text{l}$ .**

Trong trường hợp dùng vòng bơm có kích cỡ khác với khuyến cáo thì phải đảm bảo rằng giới hạn phát hiện của hệ thống (LOD)  $\leq 0,2$  ng/g (tỷ lệ tín hiệu/nhiều = 3) và giới hạn định lượng (LOQ)  $\leq 0,5$  ng/g (tỷ lệ tín hiệu/nhiều = 6) đối với từng aflatoxin (sử dụng các dung dịch chuẩn).

**5.11.3 Cột HPLC pha đảo, ví dụ  $\text{C}_{18}$  hoặc ODS-2 (dài 25 cm, đường kính trong 4,6 mm, cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ ), đảm bảo phân giải đường nền của các pic aflatoxin  $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_2$ ,  $\text{G}_1$  và  $\text{G}_2$  ra khỏi các pic khác. Sự chồng lấn tối đa của các pic phải nhỏ hơn 10 % (có thể cần điều chỉnh pha động để có độ phân giải đường nền tốt). Nên sử dụng tiền cột thích hợp.**

**5.11.4 Hệ thống tạo dẫn xuất sau cột, với PBPB (chỉ sử dụng với pha động A (4.14)).**

Gồm có bơm không xung dùng cho HPLC, chi tiết chữ T thể tích chết bằng zero, ống nối phản ứng bằng PTFE kích thước tối thiểu 45 cm x 0,5 mm đường kính trong.



**5.11.5 Hệ thống tạo dẫn xuất với brom tổng hợp bằng phương pháp điện hóa**, ví dụ: cuvet KOBRA<sup>1)</sup> (chỉ sử dụng với pha động B (4.15)).

**5.11.6 Detector huỳnh quang**, với bước sóng kích thích  $\lambda = 360$  nm và bước sóng phát xạ  $\lambda > 420$  nm hoặc tương đương (ví dụ: detector với bộ đơn sắc có thể điều chỉnh được).

Nên cài đặt detector có thể điều chỉnh được ở bước sóng 365 nm (bước sóng kích thích), 435 nm (bước sóng phát xạ) và chiều rộng băng là 18 nm.

**5.12 Dụng cụ lọc dùng một lần**, cỡ lỗ 0,45  $\mu\text{m}$ .

Trước khi sử dụng, kiểm tra để chắc chắn rằng aflatoxin không bị thất thoát trong quá trình lọc (phép thử độ thu hồi).

CHÚ THÍCH Các vật liệu lọc có khả năng giữ lại aflatoxin.

**5.13 Pipet**, dung tích 2 ml và 10 ml, với độ chính xác tối thiểu 0,5 %.

**5.14 Cân phân tích**, có thể cân đến 0,1 mg.

**5.15 Cân kỹ thuật**, có thể cân đến 0,01 g.

**5.16 Xyranh microlit hoặc pipet microlit đã hiệu chuẩn**, dung tích từ 25  $\mu\text{l}$  đến 500  $\mu\text{l}$ .

**5.17 Bộ phân phối chân không**, tùy chọn.

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hóa một lượng thích hợp (ví dụ 10 kg, [3]) quả hồ trăn, lạc và quả vả để thu được hồ nhào, ví dụ: dùng máy nghiền tốc độ cao (5.3). Thông tin về cỡ mẫu và cách lấy mẫu có thể xem trong [3].

### 6.2 Ổn định cột ái lực miễn nhiễm

Để cột ái lực miễn nhiễm (4.13) đạt đến nhiệt độ phòng trước khi ổn định. Nối cột ái lực miễn nhiễm với bộ phân phối chân không (5.17) và gắn bầu chứa (5.8) vào cột ái lực miễn nhiễm.

Để ổn định, chuyển 10 ml PBS (4.2) sang đỉnh cột và để chảy qua với tốc độ 2 ml/min đến 3 ml/min qua cột (ví dụ: bằng trọng lực). Đảm bảo rằng một phần nhỏ (0,5 ml) PBS được giữ lại trên cột cho đến khi dung dịch mẫu được sử dụng.

Thực hiện các quy trình ổn định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

<sup>1)</sup> Cuvet KOBRA là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương đương.

### **6.3 Chiết**

#### **6.3.1 Yêu cầu chung**

Sử dụng máy nghiền tốc độ cao cho quá trình chiết hồ nhão quả vả, bơ lạc và hồ nhão quả hồ trăn, vì các sản phẩm giàu chất béo (bơ lạc và hồ nhão quả hồ trăn) cần tạo dạng nhũ tương để phá vỡ lớp chất béo và để chiết được hết. Ngoài ra, hồ nhão quả vả cần được phá vỡ trong dung môi, vì nếu sử dụng máy lắc thì sẽ không thực hiện được do hồ nhão rất sánh. Bột ớt có thể chiết được bằng cách lắc (với điều kiện là bột nghiền có cỡ hạt đến 500 µm) để xử lý một số mẫu cùng một lúc và giảm nguy cơ lây nhiễm chéo.

#### **6.3.2 Quả vả**

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3) và 300 ml dung môi chiết (4.10). Trộn trong 3 min bằng máy nghiền tốc độ cao (5.3).

Lọc dịch chiết qua giấy lọc (5.5). Dùng pipet lấy 10,0 ml dịch lọc trong cho vào cốc thủy tinh có mỏ 100 ml (hoặc tương tự) và pha loãng bằng 60 ml PBS (4.2). Cho dịch chiết mẫu đã pha loãng vào bầu chứa được nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Có thể sử dụng khối hồ nhão hoặc các phần mẫu thử lớn hơn, với điều kiện là duy trì đúng tỉ lệ (mẫu - dung môi cũng như thành phần dung môi đối với khối hồ nhão).

#### **6.3.3 Lạc**

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3) và 200 ml dung môi chiết (4.10) và 100 ml n-hexan hoặc cyclohexan (4.11). Trộn trong 3 min bằng máy nghiền tốc độ cao (5.3).

Lọc dịch chiết qua giấy lọc (5.5). Trong trường hợp tách lớp dung môi thì tiến hành lọc pha dưới. Dùng pipet lấy 10,0 ml dịch lọc trong cho vào cốc thủy tinh có mỏ 100 ml (hoặc tương tự) và pha loãng bằng 60 ml PBS (4.2). Cho dịch chiết mẫu đã pha loãng vào bầu chứa được nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Việc tách lớp dung môi không xảy ra nếu lọc ngay sau khi nghiền trộn và n-hexan/cyclohexan sẽ được giữ lại trong bộ lọc. Có thể sử dụng bộ tách pha, nếu cần.

Có thể sử dụng phần mẫu thử lớn hơn với điều kiện duy trì được tỷ lệ dịch chiết mẫu - dung môi.

#### **6.3.4 Quả hồ trăn**

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3), 200 ml dung môi chiết (4.10) và 100 ml n-hexan hoặc cyclohexan (4.11). Trộn trong 3 min bằng máy nghiền tốc độ cao (5.3).

Lọc dịch chiết qua giấy lọc (5.5). Trong trường hợp tách lớp dung môi thì lọc pha dưới. Dùng pipet lấy 10,0 ml dịch lọc trong cho vào cốc thủy tinh có mỏ 100 ml (hoặc tương tự) và pha loãng bằng 60 ml PBS (4.2). Cho dịch chiết mẫu đã pha loãng vào bầu chứa được nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Nếu xuất hiện lượng kết tủa đáng kể khi pha loãng với PBS, dùng pipet lấy 20 ml dịch lọc mẫu cho vào cốc thủy tinh có mỏ 250 ml (hoặc tương tự) và pha loãng với 140 ml PBS (4.2), sau đó lọc qua giấy lọc (5.7). Trong trường hợp này cho 70 ml dịch chiết mẫu đã lọc vào bầu chứa nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Sự phân tách lớp dung môi không xảy ra nếu lọc ngay sau khi nghiền và n-hexan/xyclohexan được giữ lại trong bộ lọc. Sử dụng bộ tách pha lọc, nếu cần.

Có thể dùng phần mẫu thử lớn hơn nếu duy trì được tỷ lệ dịch chiết mẫu-dung môi.

### 6.3.5 Bột ớt

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3) và 300 ml dung môi chiết (4.10). Lắc kỹ bằng tay 15 s đến 30 s, sau đó lắc 30 min bằng máy lắc (5.4). Đối với các loại máy lắc khác nhau (ví dụ: máy lắc ngang hoặc máy lắc đứng), cần điều chỉnh tốc độ để đạt được việc khuấy trộn tối đa hỗn hợp dịch chiết.

Lọc dịch chiết qua giấy lọc (5.5). Dùng pipet lấy 10,0 ml dịch lọc trong cho vào cốc thủy tinh có mỏ 100 ml và pha loãng bằng 60 ml PBS (4.2). Cho dịch chiết mẫu đã pha loãng vào bầu chứa được nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Có thể sử dụng các phần mẫu thử lớn hơn nếu duy trì được tỷ lệ dịch chiết-dung môi.

## 6.4 Làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm

Cho dịch lọc đi qua cột với tốc độ dòng khoảng 3 ml/min (khoảng một giọt trên mỗi giây). Không vượt quá tốc độ 5 ml/min. Rửa cột với khoảng 15 ml nước, mỗi phần khoảng 5 ml ở tốc độ tối đa 5 ml/min và làm khô bằng chân không khoảng 5 s đến 10 s hoặc dùng xyranh cho không khí qua cột ái lực miễn nhiễm trong khoảng 10 s.

Rửa giải các aflatoxin bằng quy trình hai bước. Cho 0,50 ml metanol (4.7) lên cột và cho đi qua cột. Thu dịch rửa giải vào bình định mức đã hiệu chuẩn 5 ml (5.10). Đợi 1 min và đưa phần thứ hai 0,75 ml metanol lên cột. Thu phần lớn phần dung môi rửa giải đã dùng bằng cách nén không khí đi qua cột.

Thêm nước vào bình đến vạch, lắc kỹ và chỉnh lại để thu được thể tích quy định. Nếu dung dịch trong thì có thể sử dụng trực tiếp để phân tích HPLC. Nếu dung dịch không trong, lọc qua bộ lọc dùng một lần (5.12) trước khi bơm vào HPLC.

**CHÚ THÍCH** Các phương pháp nạp mẫu lên cột ái lực miễn nhiễm, rửa cột và rửa giải có thể hơi khác nhau giữa các hãng sản xuất cột. Cần tuân theo các hướng dẫn cụ thể của nhà cung cấp cột.

### 6.5 Sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Để đảm bảo độ chụm tối đa, việc bơm dung dịch chuẩn aflatoxin (thể tích bơm 200 µl) và các dịch chiết mẫu đã tinh sạch được thực hiện bằng phương thức lấy đầy vòng mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất cổng bơm hoặc van bơm. Các aflatoxin được phân tách bằng HPLC pha đảo (RP-HPLC) ở nhiệt độ phòng với cột pha đảo (5.11.3) và pha động thích hợp (4.14) hoặc (4.15). Tốc độ dòng khuyến cáo nên là 1 ml/min với cột có đường kính trong là 4,6 mm. Do đó, tốc độ dòng có thể được điều chỉnh theo kích thước cột. Các aflatoxin rửa giải theo thứ tự G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> và B<sub>1</sub> với thời gian lưu khoảng 6 min, 8 min, 9 min và 11 min tương ứng và độ phân giải đường nền tốt. Pha động có thể được điều chỉnh bằng cách thêm nước, metanol hoặc axetonitril để có được độ phân giải pic và hiệu suất quả sắc ký tối đa (sắc ký đồ điển hình được nêu trong Phụ lục A).

### 6.6 Tạo dẫn xuất sau cột

Khi sử dụng PBPB, gắn chi tiết chữ T và ống phản ứng (xem 5.11.4), sau đó vận hành với các thông số sau:

- tốc độ dòng 1,00 ml/min đối với pha động (xem 6.5);
- tốc độ dòng 0,30 ml/min đối với thuốc thử (tốc độ dòng có thể điều chỉnh đến tốc độ dòng của pha động).

Khi sử dụng brom tổng hợp bằng phương pháp điện hóa (cuvet KOBRA®) thực hiện theo các hướng dẫn lắp đặt cuvet của các nhà sản xuất và vận hành với các thông số sau:

- tốc độ dòng 1,00 ml/min đối với pha động (xem 6.5);
- dòng điện 100 µA.

### 6.7 Đường chuẩn

Chuẩn bị đường chuẩn, sử dụng các dung dịch chuẩn aflatoxin hỗn hợp như trong (4.21). Các dung dịch này bao trùm dải từ 0,5 ng/g đến 4,5 ng/g đối với aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub>, và dải từ 0,1 ng/g đến 0,9 ng/g đối với B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub>. Dụng cụ đường chuẩn trước khi phân tích theo Bảng 2 và kiểm tra độ tuyến tính của đường chuẩn.

Nếu các hàm lượng aflatoxin trong mẫu nằm ngoài dải đường chuẩn, dung dịch bơm để phân tích HPLC có thể cần được pha loãng để có hàm lượng aflatoxin thích hợp với đường chuẩn.

### 6.8 Quy trình thêm chuẩn

Để xác định độ thu hồi có thể sử dụng quy trình thêm chuẩn, dùng dung dịch metanol (4.2.2) thêm chuẩn. Mức thêm chuẩn phải nằm trong dải hiệu chuẩn (tốt nhất là giá trị trung bình). Lấy cẩn thận không nhiều hơn 2 ml dung dịch thêm chuẩn sau đó để cho bay hơi ở nơi tối và trong khoảng từ 30 min đến 2 h.

## 6.9 Tính kết quả

Đối với các quy trình chuẩn bị mẫu sử dụng n-hexan hoặc cyclohexan, thì thể tích của các dung môi này không đưa vào để tính toán kết quả. Việc bổ sung n-hexan hoặc cyclohexan vào hỗn hợp dung môi chiết chỉ cần để có thể phá vỡ lớp chất béo (aflatoxin bị bao trong màng). Aflatoxin không hòa tan trong n-hexan hoặc cyclohexan. Dụng cụ chuẩn sử dụng đường hồi quy tuyến tính và tính nồng độ aflatoxin trong dung dịch bơm từ mỗi mẫu, tính bằng nanogram trên mililit.

Tính phần khối lượng của các aflatoxin,  $w$ , bằng nanogram trên gam mẫu theo công thức (2):

$$w = \frac{\rho_{smp} \times V_e \times V_{final}}{m_s \times V_{iac}} \quad (2)$$

Trong đó:

$\rho_{smp}$  là nồng độ khối lượng của aflatoxin trong dung dịch bơm tính được từ đường hồi quy tuyến tính, tính bằng nanogram trên mililit (ng/ml);

$V_e$  là thể tích của dung môi chiết, tính bằng mililit (ml) ( $V_e = 200$  ml đối với bơ lạc và hồ nhão quả hồ trăn và  $V_e = 300$  ml đối với hồ nhão quả vã và bột ớt);

$V_{final}$  là thể tích cuối cùng thu được sau khi rửa giải từ IAC, tính bằng mililit (ml) (trong trường hợp này là 5 ml);

$m_s$  là khối lượng mẫu đưa vào tính toán, tính bằng gam (g), (trong trường hợp này là 50 g);

$V_{iac}$  là thể tích mẫu chiết được lấy để làm sạch cột ái lực miễn nhiễm, tính bằng mililit (ml) (trong trường hợp này là 10 ml).

## 6.10 Khẳng định các aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub>

Để khẳng định sự có mặt các aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub>, tháo cột HPLC ra khỏi thiết bị brom hóa và nối trực tiếp với detector huỳnh quang. Các tín hiệu aflatoxin B<sub>1</sub> và G<sub>1</sub> thấp hơn đáng kể (10 lần hoặc nhiều hơn) khi hệ thống tạo dẫn suất bị ngắt. Không tắt dòng điện với các thiết bị brom hóa khi đang hoạt động vì brom có thể vẫn còn giữ lại trong màng cuvet của thiết bị.

## 7 Độ chụm

### 7.1 Yêu cầu chung

Chi tiết của phép thử nghiệm liên phòng về độ chụm của phương pháp nêu trong Phụ lục B. Các giá trị nhận được từ các thử nghiệm liên phòng có thể không áp dụng đối với dải nồng độ và nền mẫu khác với dải nồng độ và nền mẫu nêu trong Phụ lục B.

## 7.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm riêng rẽ thu được được tìm thấy trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn độ lặp lại  $r$ .

## Các giá trị đối với bơ lạc:

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,9 \text{ ng/g}$	$r = 0,25 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,9 \text{ ng/g}$	$r = 0,73 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,6 \text{ ng/g}$	$r = 0,31 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,9 \text{ ng/g}$	$r = 1,88 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,8 \text{ ng/g}$	$r = 0,14 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,3 \text{ ng/g}$	$r = 0,22 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,5 \text{ ng/g}$	$r = 0,28 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,2 \text{ ng/g}$	$r = 0,45 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,4 \text{ ng/g}$	$r = 0,36 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 5,0 \text{ ng/g}$	$r = 0,64 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)

## Các giá trị đối với hồ nhào quả hồ trăn:

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,9 \text{ ng/g}$	$r = 0,36 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,0 \text{ ng/g}$	$r = 0,67 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,3 \text{ ng/g}$	$r = 0,36 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,8 \text{ ng/g}$	$r = 5,10 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,7 \text{ ng/g}$	$r = 0,22 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 0,8 \text{ ng/g}$	$r = 0,28 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,5 \text{ ng/g}$	$r = 0,76 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,7 \text{ ng/g}$	$r = 0,87 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 2,9 \text{ ng/g}$	$r = 1,65 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 3,3 \text{ ng/g}$	$r = 1,85 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)

## Các giá trị đối với hồ nhào quả và:

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,1 \text{ ng/g}$	$r = 0,50 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
----------------------------	------------------------------	-------------------------	-----------------

Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,2 \text{ ng/g}$	$r = 1,12 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,6 \text{ ng/g}$	$r = 1,09 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,8 \text{ ng/g}$	$r = 2,83 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} \approx 1,3 \text{ ng/g}$	$r = 0,34 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,8 \text{ ng/g}$	$r = 0,70 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 2,1 \text{ ng/g}$	$r = 0,34 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 3,8 \text{ ng/g}$	$r = 1,23 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 2,6 \text{ ng/g}$	$r = 1,15 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 5,2 \text{ ng/g}$	$r = 2,52 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)

#### Các giá trị đối với bột ớt :

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,9 \text{ ng/g}$	$r = 0,14 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,7 \text{ ng/g}$	$r = 0,31 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,4 \text{ ng/g}$	$r = 0,50 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,1 \text{ ng/g}$	$r = 2,02 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,8 \text{ ng/g}$	$r = 0,34 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 0,9 \text{ ng/g}$	$r = 0,45 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,4 \text{ ng/g}$	$r = 0,39 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,0 \text{ ng/g}$	$r = 0,64 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,0 \text{ ng/g}$	$r = 0,36 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 4,5 \text{ ng/g}$	$r = 0,62 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)

### 7.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi sử dụng trên vật liệu giống thử hết nhau bởi hai phòng thử nghiệm không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn độ tái lập R.

#### Các giá trị đối với bơ lạc:

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,9 \text{ ng/g}$	$R = 0,45 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,9 \text{ ng/g}$	$R = 0,98 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,6 \text{ ng/g}$	$R = 1,85 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,9 \text{ ng/g}$	$R = 4,93 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)

**TCVN 10638:2014**

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,8 \text{ ng/g}$	$R = 0,73 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,3 \text{ ng/g}$	$R = 1,29 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,5 \text{ ng/g}$	$R = 0,62 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,2 \text{ ng/g}$	$R = 0,90 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,4 \text{ ng/g}$	$R = 1,82 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 5,0 \text{ ng/g}$	$R = 2,69 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)

**Các giá trị đối với hồ nhão quả hồ trăn:**

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,9 \text{ ng/g}$	$R = 0,42 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,0 \text{ ng/g}$	$R = 1,01 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,3 \text{ ng/g}$	$R = 2,86 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,8 \text{ ng/g}$	$R = 5,1 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,7 \text{ ng/g}$	$R = 0,34 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 0,8 \text{ ng/g}$	$R = 0,48 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,5 \text{ ng/g}$	$R = 1,01 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,7 \text{ ng/g}$	$R = 1,18 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 2,9 \text{ ng/g}$	$R = 1,71 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 3,3 \text{ ng/g}$	$R = 2,02 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)

**Các giá trị đối với hồ nhão quả và:**

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,1 \text{ ng/g}$	$R = 0,59 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,2 \text{ ng/g}$	$R = 2,04 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,6 \text{ ng/g}$	$R = 1,29 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,8 \text{ ng/g}$	$R = 3,58 \text{ ng/g}$	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,3 \text{ ng/g}$	$R = 0,84 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,8 \text{ ng/g}$	$R = 2,24 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 2,1 \text{ ng/g}$	$R = 0,87 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 3,8 \text{ ng/g}$	$R = 2,88 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 2,6 \text{ ng/g}$	$R = 2,04 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 5,2 \text{ ng/g}$	$R = 4,37 \text{ ng/g}$	(nhiễm tự nhiên)



**Các giá trị đối với bột ớt :**

Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,9$ ng/g	$R = 0,25$ ng/g	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 1,7$ ng/g	$R = 0,95$ ng/g	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,4$ ng/g	$R = 0,98$ ng/g	(được thêm vào)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 7,1$ ng/g	$R = 2,83$ ng/g	(được thêm vào)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 0,8$ ng/g	$R = 0,45$ ng/g	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 0,9$ ng/g	$R = 0,87$ ng/g	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 1,4$ ng/g	$R = 0,67$ ng/g	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 2,0$ ng/g	$R = 1,54$ ng/g	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin B <sub>1</sub> :	$\bar{x} = 3,0$ ng/g	$R = 0,78$ ng/g	(nhiễm tự nhiên)
Aflatoxin tổng số:	$\bar{x} = 4,5$ ng/g	$R = 1,85$ ng/g	(nhiễm tự nhiên)

**8 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc mẫu, tên gọi);
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả thử nghiệm thu được và các đơn vị biểu thị kết quả;
- các điểm đặc trưng quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, có thể ảnh hưởng đến kết quả.

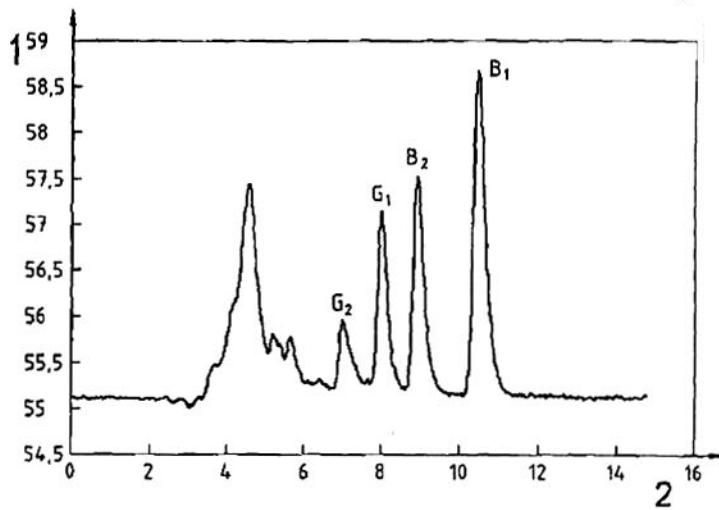
**Phụ lục A**

(tham khảo)

**Sắc ký đồ điển hình**

Các điều kiện vận hành để có được các Hình A.1 đến A.4:

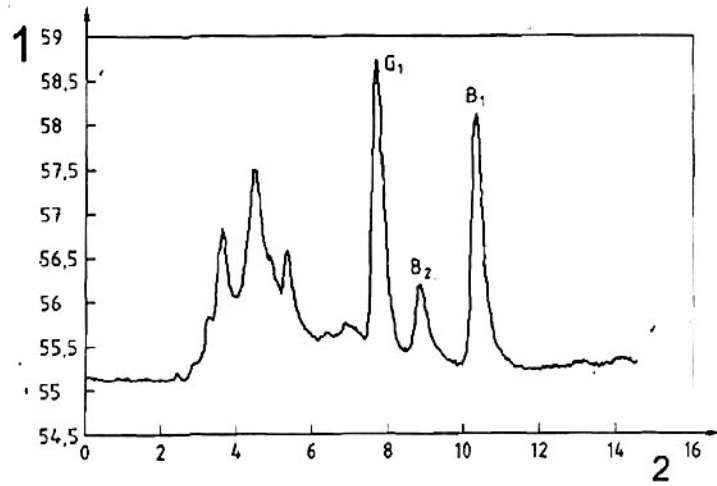
Thể tích bơm:	200 $\mu$ l
Cột	C-18 (dài 25 cm, đường kính trong 4,6 mm và cỡ hạt 5 $\mu$ m)
Tốc độ dòng	1 ml/min
Pha động	nước-metanol-axetonitril (6:3:2 [thể tích]) chứa 120 mg KBr và 350 $\mu$ l HNO <sub>3</sub> (c(HNO <sub>3</sub> ) = 4 mol/l)
Dẫn xuất	brom được tổng hợp bằng phương pháp điện hóa (cuvet KOBRA®)
Detector	huỳnh quang (bước sóng kích thích: 365 nm, bước sóng phát xạ: 435 nm)



**CHÚ DẪN**

- 1 Huỳnh quang tính bằng milivon (mV)
- 2 Thời gian tính bằng phút (min)

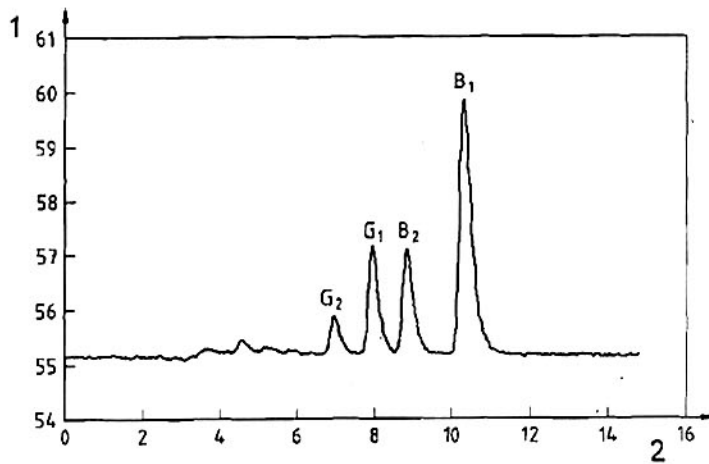
**Hình A.1 – Sắc ký đồ điển hình của aflatoxin trong hồ nhão quả và nhiễm tự nhiên sau khi làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm (mức nhiễm aflatoxin B<sub>1</sub> 1 ng/g)**



## CHÚ DẪN

- 1 Huỳnh quang tính bằng milivon (mV)
- 2 Thời gian tính bằng phút (min)

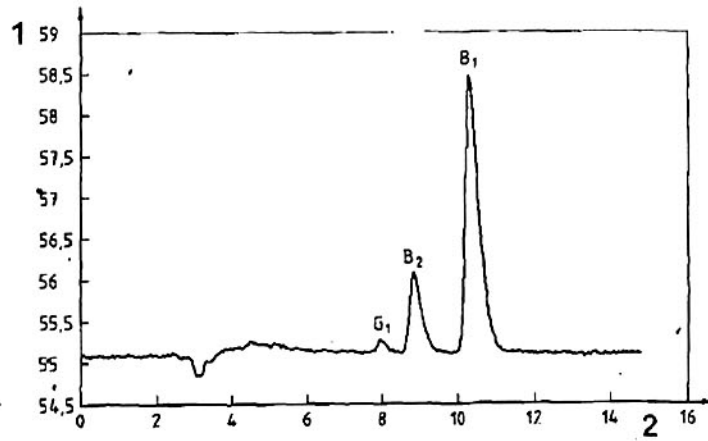
**Hình A.2 – Sắc ký đồ điện hình của aflatoxin trong bột ớt nhiễm tự nhiên sau khi làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm (mức nhiễm aflatoxin B<sub>1</sub> 1 ng/g)**



## CHÚ DẪN

- 1 Huỳnh quang tính bằng milivon (mV)
- 2 Thời gian tính bằng phút (min)

**Hình A.3 – Sắc ký đồ điện hình của aflatoxin trong bơ lạc nhiễm tự nhiên sau khi làm sạch bằng ái lực miễn nhiễm (mức nhiễm aflatoxin B<sub>1</sub> 1 ng/g)**



CHÚ DẪN

- 1 Huỳnh quang tính bằng milivon (mV)
- 2 Thời gian tính bằng phút (min)

**Hình A.4 – Sắc ký đồ điện hình của aflatoxin trong khối nhão quả hồ trăn nhiễm tự nhiên sau khi làm sạch bằng ái lực miễn nhiễm (mức nhiễm aflatoxin B<sub>1</sub> 1 ng/g)**

## Phụ lục B

(tham khảo)

## Dữ liệu về độ chụm

Dữ liệu sau đây thu được trong các phép thử nghiệm liên phòng do Cộng đồng châu Âu tổ chức thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), TCVN 6910-4 (ISO 5725-4) và TCVN 6910-6 (ISO 5725-6). Phép thử liên phòng đã nghiên cứu trên các mẫu bơ lạc, khối nhào quả hồ trăn, khối nhào quả vã và bột ớt nhiễm tự nhiên và thêm chuẩn aflatoxin [4].

Bảng B.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với bơ lạc

Thông số	Aflatoxin B <sub>1</sub>					Aflatoxin tổng số				
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Số lượng mẫu										
Năm thử nghiệm liên phòng	1998					1998				
Số lượng phòng thử nghiệm	16					16				
Số lượng của mẫu (kép)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	15	13	15	14	14	15	15	15	13	14
Số ngoại lệ	1	3	1	2	2	1	1	1	3	2
Số kết quả được chấp nhận	15	13	15	14	14	15	15	15	13	14
Giá trị trung bình $\bar{x}$ , ng/g	0,87	3,65	0,80	1,52	3,40	1,9	7,9	1,3	2,2	5,0
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ , ng/g	0,09	0,11	0,05	0,10	0,13	0,26	0,67	0,08	0,16	0,23
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r$ , %	10	3	6	6	4	13	9	6	7	5
Giới hạn lặp lại $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], ng/g	0,25	0,31	0,14	0,28	0,36	0,73	1,88	0,22	0,45	0,64
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ , ng/g	0,16	0,66	0,26	0,22	0,65	0,35	1,76	0,46	0,32	0,96
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R$ , %	19	18	32	14	19	18	22	34	14	19
Giới hạn tái lập $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], ng/g	0,45	1,85	0,73	0,62	1,82	0,98	4,93	1,29	0,90	2,69
Độ thu hồi, %	87	91	-	-	-	81	82	-	-	-
<sup>a</sup> mẫu thêm chuẩn <sup>b</sup> mẫu nhiễm tự nhiên										

Bảng B.2 – Dữ liệu về độ chụm đối với khối nhão quả hồ trăn

Thông số	Aflatoxin B <sub>1</sub>					Aflatoxin tổng số				
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Số lượng mẫu										
Năm thử nghiệm liên phòng	1998					1998				
Số lượng phòng thử nghiệm	16					16				
Số lượng của mẫu (kép)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	15	12	13	15	14	14	14	13	15	14
Số ngoại lệ	1	4	3	1	2	2	2	3	1	2
Số kết quả được chấp nhận	15	12	13	15	14	14	14	13	15	14
Giá trị trung bình $\bar{x}$ , ng/g	0,94	3,29	0,74	1,54	2,93	2,0	7,8	0,8	1,7	3,3
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ , ng/g	0,13	0,13	0,08	0,27	0,59	0,24	1,82	0,10	0,31	0,66
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r$ , %	14	4	11	18	20	12	23	12	18	20
Giới hạn lặp lại $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], ng/g	0,36	0,36	0,22	0,76	1,65	0,67	5,10	0,28	0,87	1,85
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ , ng/g	0,15	1,02	0,12	0,36	0,61	0,36	1,82	0,17	0,42	0,72
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R$ , %	16	31	17	23	21	18	23	21	24	22
Giới hạn tái lập $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], ng/g	0,42	2,86	0,34	1,01	1,71	1,01	5,1	0,48	1,18	2,02
Độ thu hồi, %	94	82	-	-	-	83	81	-	-	-
<sup>a</sup> mẫu thêm chuẩn										
<sup>b</sup> mẫu nhiễm tự nhiên										

Bảng B.3 – Dữ liệu về độ chụm đối với khối nhão quả và

Thông số	Aflatoxin B <sub>1</sub>					Aflatoxin tổng số				
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Số lượng mẫu										
Năm thử nghiệm liên phòng	1998					1998				
Số lượng phòng thử nghiệm	16					16				
Số lượng của mẫu (kép)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	15	15	16	14	16	15	15	16	16	16
Số ngoại lệ	1	1	0	2	0	1	1	0	0	0
Số kết quả được chấp nhận	15	15	16	14	16	15	15	16	16	16
Giá trị trung bình $\bar{x}$ , ng/g	1,10	3,60	1,32	2,07	2,55	2,2	7,8	2,8	3,8	5,2
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ , ng/g	0,18	0,39	0,12	0,12	0,41	0,40	1,01	0,25	0,44	0,90
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r$ , %	17	11	10	6	16	18	13	9	12	17
Giới hạn lặp lại $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], ng/g	0,5	1,09	0,34	0,34	1,15	1,12	2,83	0,7	1,23	2,52
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ , ng/g	0,21	0,46	0,30	0,31	0,73	0,73	1,28	0,80	1,03	1,56
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R$ , %	19	13	23	15	29	32	17	28	29	30
Giới hạn tái lập $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], ng/g	0,59	1,29	0,84	0,87	2,04	2,04	3,58	2,24	2,88	4,37
Độ thu hồi, %	109	90	-	-	-	92	81	-	-	-
<sup>a</sup> mẫu thêm chuẩn										
<sup>b</sup> mẫu nhiễm tự nhiên										

Bảng B.4 – Dữ liệu về độ chụm đối với bột ốt

Thông số	Aflatoxin B <sub>1</sub>					Aflatoxin tổng số				
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Số lượng mẫu	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Năm thử nghiệm liên phòng	1998					1998				
Số lượng phòng thử nghiệm	16					16				
Số lượng của mẫu (kép)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Số lượng phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	14	15	15	15	14	13	15	16	16	14
Số ngoại lệ	2	1	1	1	2	3	1	0	0	2
Số kết quả được chấp nhận	14	15	15	15	14	13	15	16	16	14
Giá trị trung bình $\bar{x}$ , ng/g	0,86	3,41	0,84	1,39	3,02	1,7	7,1	0,9	2,0	4,5
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ , ng/g	0,05	0,18	0,12	0,14	0,13	0,11	0,72	0,16	0,23	0,22
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r$ , %	6	5	14	10	4	6	10	17	12	5
Giới hạn lặp lại $r$ [ $r = 2,8 \times s_r$ ], ng/g	0,14	0,5	0,34	0,39	0,36	0,31	2,02	0,45	0,64	0,62
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ , ng/g	0,09	0,35	0,16	0,24	0,28	0,34	1,01	0,31	0,55	0,66
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R$ , %	10	10	19	17	9	20	14	34	28	15
Giới hạn tái lập $R$ [ $R = 2,8 \times s_R$ ], ng/g	0,25	0,98	0,45	0,67	0,78	0,95	2,83	0,87	1,54	1,85
Độ thu hồi, %	86	85	-	-	-	71	74	-	-	-
<sup>a</sup> mẫu thêm chuẩn										
<sup>b</sup> mẫu nhiễm tự nhiên										



**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
  - [2] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
  - [3] TCVN 6910-4:2001 (ISO 5725-4:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 4: Các phương pháp cơ bản xác định độ đúng của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
  - [4] TCVN 6910-6:2002 (ISO 5725-6:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 6: Sử dụng các giá trị độ chính xác trong thực tế.*
  - [5] Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in laboratory wastes. Castegnaro, M., Hunt D.C., Sansone E.B., Schuller P.L., Siriwardana M.G., Telling G.M., van Egmond H.P. and Walker E.A. IARC Scientific publication no. 37, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon (France), 1980, 59 p.
  - [6] Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. Castegnaro M., Barek J., Fremy J.M., Lafontaine M., Miraglia M., Sansone E.B. and Telling G.M. IARC publication no. 113, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon (France), 1991, 63 p.
  - [7] Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal L 201, 17/07/1998, 93-101
  - [8] Stroka J, Anklam E, Joerissen U, Gilbert J (2000) Immunoaffinity cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study, Journal of the AOAC International 83: 320-340
-