

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9711:2013

EN 14352:2004

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH FUMONISIN B₁ VÀ B₂
TRONG THỰC PHẨM TỪ NGÔ – PHƯƠNG PHÁP HPLC
CÓ LÀM SẠCH BẰNG CỘT ÁI LỰC MIỄN NHIỄM**

*Foodstuffs – Determination of fumonisin B₁ and B₂ in maize based foods –
HPLC method with immunoaffinity column clean up*

HÀ NỘI – 2013

Lời nói đầu

TCVN 9711:2013 hoàn toàn tương đương với EN 14352:2004;

TCVN 9711:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F1
Ngũ cốc và đậu đỗ biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng
thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm – Xác định fumonisin B₁ và B₂ trong thực phẩm từ ngô – Phương pháp HPLC có làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm

Foodstuffs – Determination of fumonisin B₁ and B₂ in maize based foods – HPLC method with immunoaffinity column clean up

CẢNH BÁO: Fumonisin là chất độc đối với gan, thận và là chất gây ung thư đối với các loài gặm nhấm và chuột. Ảnh hưởng lên người chưa được biết đầy đủ. Cần phải có các cảnh báo an toàn thích hợp đối với việc xử lý fumonisin. Nếu fumonisin bị rót ra ngoài phải được rửa bằng dung dịch natri hypoclorit 5 %. Axetonitril là chất độc nguy hiểm và mẫu cần được lắc bằng máy lắc tiến hành trong tủ hút.

Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể cần phải sử dụng các vật liệu, thiết bị và các thao tác nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đề cập đến các vấn đề an toàn khi 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 quy định phương pháp xác định hàm lượng fumonisin B₁ (FB₁) và fumonisin B₂ (FB₂) trong thực phẩm từ ngô sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm, xem [1], [2], [3].

Phương pháp này đã được đánh giá thành công trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm theo Hướng dẫn của AOAC về các quy trình nghiên cứu cộng tác [4] để đánh giá xác nhận tính đặc thù của phương pháp phân tích đối với phép xác định fumonisin trong bột ngô và bánh ngô chứa từ 323 µg/kg đến 1414 µg/kg FB₁ và 90 µg/kg đến 558 µg/kg FB₂.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Nguyên tắc

Fumonisin được chiết từ mẫu bằng hỗn hợp nước, metanol và axetonitril. Dịch chiết sau khi lọc được làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm và fumonisin được rửa giải bằng metanol. Cho bay hơi dịch chiết, phần cặn được hòa tan lại trong hỗn hợp axetonitril và nước, bổ sung o-phthaldialdehyt-2-mercaptoetanol (OPA-MCE) để tạo thành dẫn xuất fumonisin huỳnh quang. Dẫn xuất được phân tích bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) sử dụng detector huỳnh quang.

4 Thuốc thử

4.1 Yêu cầu chung

Trong quá trình phân tích, tất cả các thuốc thử được sử dụng phải thuộc loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước loại 1 trong TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Dung môi phải đạt chất lượng dùng cho phân tích HPLC.

4.2 Metanol.

4.3 Axetonitril.

4.4 Axit o-phosphoric, phần thể tích $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85\%$.

4.5 o-phthaldialdehyt (OPA).

4.6 2-mercaptoetanol (MCE).

4.7 Dung dịch natri dihydro phosphat, nồng độ $c(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$

Hòa tan 15,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong 1 l nước cất.

4.8 Dung dịch dinatri tetraborat, $c(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$

Hòa tan 3,8 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ trong 100 ml nước cất.

4.9 Natri clorua (NaCl).

4.10 Dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4).

4.11 Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4).

4.12 Kali clorua (KCl).

4.13 Axit clohydric (HCl), đậm đặc.

4.14 Dung môi chiết

Trộn 25 phần thể tích axetonitril (4.3) với 25 phần thể tích metanol (4.2) và 50 phần thể tích nước.

4.15 Dung dịch axetonitril-nước, phần thể tích $\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 50 \%$

Trộn 50 phần thể tích axetonitril (4.3) với 50 phần thể tích nước.

4.16 Dung dịch muối đệm phosphat (PBS)

Hòa tan 8,0 g natri clorua (4.9), 1,2 g dinatri hydro phosphat (4.10), 0,2 g kali dihydro phosphat (4.11) và 0,2 g kali clorua (4.12) trong khoảng 990 ml nước. Chỉnh pH đến 7,0 bằng axit clohydric đậm đặc (4.13) và thêm nước đến 1 l. Có thể sử dụng viên muối đệm phosphat hoặc dung dịch muối đệm phosphat pha sẵn.

4.17 Cột ái lực miễn nhiễm (IAC)

Cột ái lực miễn nhiễm phải chứa các kháng thể kháng fumonisin FB_1 và fumonisin FB_2 . Cột phải có tổng dung lượng không nhỏ hơn 5 μg fumonisin và phải có độ thu hồi không nhỏ hơn 90 % đối với FB_1 và FB_2 khi cho dung dịch chuẩn chứa 5 μg fumonisin trong hỗn hợp của metanol và PBS đi qua cột. Có thể sử dụng lên đến 10 phần thể tích metanol hoặc axetonitril trong hỗn hợp với PBS. Trước khi sử dụng, cột phải được làm ấm đến nhiệt độ phòng.

4.18 Pha động HPLC

Trộn 77 phần thể tích metanol (4.2) với 23 phần thể tích dung dịch natri dihydro phosphat (4.7). Điều chỉnh đến pH 3,35 bằng axit o-phosphoric (4.4). Lọc dung dịch qua bộ lọc màng (5.14).

Có thể phải điều chỉnh thành phần pha động để phù hợp với từng đặc tính của cột HPLC.

4.19 Thuốc thử tạo dẫn xuất

Hòa tan 40 mg OPA (4.5) trong 1 ml metanol (4.2) và pha loãng bằng 5 ml dung dịch dinatri tetraborat (4.8). Thêm 50 μl MCE (4.6) và trộn. Dung dịch đã pha ổn định đến một tuần ở nhiệt độ phòng ở nơi tối trong bình nhỏ tối màu có nắp.

4.20 Dung dịch gốc FB_1 và FB_2

Chuẩn bị dung dịch gốc FB_1 và dung dịch gốc FB_2 trong axetonitril-nước (4.15) ở nồng độ khối lượng 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đối với từng chất chuẩn. Bảo quản các dung dịch này ở nhiệt độ khoảng 4 °C.

Các dung dịch gốc fumonisin ổn định ít nhất 6 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4 °C.

4.21 Dung dịch gốc fumonisin hỗn hợp

Chuẩn bị dung dịch gốc hỗn hợp bằng cách dùng pipet lấy 1000 μl dung dịch gốc FB_1 và 500 μl dung dịch gốc FB_2 cho vào bình định mức dung tích 5 ml. Pha loãng đến vạch bằng dung dịch axetonitril-nước (4.15) và lắc mạnh để thu được dung dịch gốc hỗn hợp chứa 10 ng $\text{FB}_1/\mu\text{l}$ và 5 ng $\text{FB}_2/\mu\text{l}$.

TCVN 9711:2013

Dung dịch này ổn định ở + 4 °C ít nhất 6 tháng. Có thể dùng các thể tích ít hơn để chuẩn bị dung dịch gốc fumonisin hỗn hợp.

4.22 Dung dịch chuẩn fumonisin hỗn hợp cho HPLC

Chuẩn bị bốn dung dịch chuẩn hỗn hợp HPLC trong bốn bình định mức dung tích 5 ml theo Bảng 1. Pha loãng từng dung dịch chuẩn đến vạch (5 ml) bằng dung dịch axetonitril-nước (4.15) và trộn kỹ.

Dung dịch này ổn định ở + 4 °C ít nhất 6 tháng. Có thể dùng các thể tích ít hơn để chuẩn bị dung dịch chuẩn fumonisin hỗn hợp.

Bảng 1 – Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp dùng cho HPLC

Dung dịch chuẩn hỗn hợp	Thể tích lấy từ dung dịch gốc hỗn hợp, μl	Thể tích dung dịch axetonitril-nước cần bổ sung, μl	Nồng độ fumonisin cuối cùng của dung dịch chuẩn hỗn hợp, ng/ μl	
			FB ₁	FB ₂
1	50	4 950	0,10	0,050
2	125	4 875	0,25	0,125
3	500	4 500	1,00	0,500
4	1 000	4 000	2,00	1,000

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường

Và cụ thể như sau:

5.2 Máy lắc tròn.

5.3 Bình ly tâm, dung tích 250 ml, có nắp vặn.

5.4 Máy ly tâm, có thể tạo lực ly tâm lên đến 2 500 g.

5.5 Giấy lọc, có cỡ lỗ 20 μm đến 25 μm .

5.6 Giấy lọc vi sợi thủy tinh, có cỡ lỗ 11 μm .

5.7 Bầu chứa, dung tích 25 ml có bộ nối đầu tip dùng cho cột ái lực miễn nhiễm (IAC).

5.8 Xyranh microlit hoặc micropipet chia vạch, 25 μl đến 1 000 μl .

5.9 Cân phòng thử nghiệm, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

5.10 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.11 Bộ cấp chân không để điều tiết cột ái lực miễn nhiễm.

5.12 Máy trộn Vortex.

5.13 Bộ cô dung môi, có modul nhiệt hoặc tương đương.

5.14 Bộ lọc màng, dùng để lọc nước, có cỡ lỗ 0,45 μm .

5.15 Thiết bị HPLC, bao gồm:

5.15.1 Bơm HPLC, đẳng dòng, phù hợp với tốc độ dòng không đổi, ví dụ: 1 ml/min.

5.15.2 Hệ thống bơm, có thể phân phối thể tích, ví dụ: 20 μl .

5.15.3 Cột tách pha đảo phân tích, ví dụ octyldecylsilan (ODS), đảm bảo độ phân giải đường nền của các pic fumonisin so với các pic khác, có các đặc tính sau:

- được làm bằng thép không gỉ;
- dài 150 mm;
- đường kính trong 4,6 mm;
- pha tĩnh có cỡ hạt 5 μm ;
- cột bảo vệ pha đảo tương ứng phù hợp.

Có thể sử dụng cột có đường kính khác.

5.15.4 Detector huỳnh quang, được gắn với cuvet dòng chảy và cài đặt ở bước sóng 335 nm (kích thích) và 440 nm (phát xạ). Có thể phát hiện được ít nhất 0,5 ng FB_1 và FB_2 (tín hiệu/nhiều = 3).

5.15.5 Hệ thống phân tích dữ liệu.

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi chất lượng trong suốt quá trình bảo quản và vận chuyển.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền mẫu cho qua sàng 1 mm và đồng nhất mẫu.

7.2 Chiết

Cân 20 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 g, cho vào bình ly tâm 250 ml (5.3) và thêm 50 ml dung môi chiết (4.14). Đậy bình ly tâm và lắc trong 20 min bằng máy lắc tròn (5.2). Ly tâm bằng máy ly tâm (5.4) trong 10 min với gia tốc 2 500 g và lọc lớp trên qua giấy lọc (5.5), tránh để phần chất khô vào giấy lọc. Chiết lại phần chất khô còn lại bằng cách thêm 50 ml dung môi chiết vào bình ly tâm và lắc tiếp trong 20 min. Ly tâm 10 min với gia tốc 2500 g và lọc dịch chiết qua giấy lọc.

Trộn hai dịch lọc chiết được và hút 10 ml dịch lọc vào bình 100 ml. Thêm 40 ml PBS (4.16) vào 10 ml dịch lọc và trộn kỹ. Lọc dịch chiết đã pha loãng qua màng lọc vi sợi (5.6) và thu lấy 10 ml dịch lọc (tương đương 0,4 g mẫu thử) sau đó làm sạch qua cột ái lực miễn nhiễm (4.17).

7.3 Làm sạch bằng ái lực miễn nhiễm

Tháo nắp trên khỏi cột và nối với bầu chứa (5.7). Tháo nắp dưới khỏi cột và nối với bộ cấp chân không (5.11). Dùng pipet hút 10 ml phần lỏng của mẫu chiết đã lọc cho vào bầu chứa. Để dịch lọc chảy qua cột từ 1 giọt đến 2 giọt mỗi giây và loại bỏ dịch qua cột. Rửa cột bằng 10 ml PBS (4.16) ở tốc độ 1 giọt đến 2 giọt mỗi giây cho đến khi không khí đi qua cột. Loại bỏ nước rửa và đặt bình 4 ml dưới cột. Rửa giải fumonisin bằng 1,5 ml metanol (4.2), ở tốc độ dòng không quá 1 giọt mỗi giây. Dùng bộ cô (5.13) cho bay hơi dịch rửa giải đến khô dưới dòng hơi nitơ ở nhiệt độ khoảng 60 °C hoặc nhỏ hơn. Giữ lại phần cặn đã khô ở nhiệt độ khoảng 4 °C cho đến khi tạo dẫn xuất và phân tích trên HPLC.

7.4 Tạo dẫn xuất

7.4.1 Dung dịch hiệu chuẩn

Chuyển 50 µl của mỗi dung dịch chuẩn fumonisin hỗn hợp (4.22) vào đáy của ống nghiệm nhỏ và thêm 50 µl thuốc thử tạo dẫn xuất (4.19) ngay trước khi phân tích mỗi dung dịch chuẩn. Trộn đều dung dịch trong 30 s bằng máy trộn Vortex (5.12) và tiến hành tách bằng HPLC (7.5.2) ở các thời điểm lặp lại trong vòng 3 min sau khi bổ sung thuốc thử tạo dẫn xuất. Ngoài ra, có thể tiến hành dẫn xuất trong hệ thống tự động. Nồng độ fumonisin cuối cùng trong các dung dịch hiệu chuẩn được liệt kê trong Bảng 2.

Bảng 2 – Nồng độ cuối cùng của dung dịch hiệu chuẩn sau khi dẫn xuất

Dung dịch hiệu chuẩn	Nồng độ fumonisin cuối cùng trong dung dịch hiệu chuẩn (ng/μl)	
	FB ₁	FB ₂
1	0,050	0,025
2	0,125	0,063
3	0,500	0,250
4	1,000	0,500

7.4.2 Dung dịch mẫu thử

Hòa tan phần cặn mẫu đã tinh sạch từ 7.3 trong 200 μl dung dịch axetonitril-nước (4.15). Chuyển 50 μl dịch chiết vào đáy của ống nghiệm nhỏ và thêm 50 μl thuốc thử tạo dẫn xuất (4.19) ngay trước khi phân tích mỗi dung dịch chiết. Trộn đều dung dịch trong 30 s bằng máy trộn Vortex (5.12) và tiến hành tách bằng HPLC (7.5.3) ở các thời điểm lặp lại trong vòng 3 min sau khi bổ sung thuốc thử tạo dẫn xuất.

7.5 HPLC

7.5.1 Các điều kiện vận hành HPLC

Khi cột đáp ứng quy định trong 5.15.3 (kích thước 4,6 mm x 150 mm có cỡ lỗ 5 μm) và sử dụng pha động quy định trong 4.18, các thông số cài đặt như sau được cho là thích hợp:

- tốc độ dòng pha động (cột): 1,0 ml/min;
- detector huỳnh quang, bước sóng phát xạ: 440 nm;
- detector huỳnh quang, bước sóng kích thích: 335 nm;
- thể tích bơm: 20 μl.

7.5.2 Đường chuẩn

Chuẩn bị đường chuẩn đối với FB₁ và FB₂ trong mỗi ngày phân tích hoặc khi thay đổi các điều kiện sắc ký bằng cách sử dụng dung dịch hiệu chuẩn fumonisin 1, 2, 3 và 4 theo Bảng 2.

Bơm 20 μl của từng dung dịch hiệu chuẩn đã tạo dẫn xuất (7.4.1) vào hệ thống HPLC ở các thời điểm lặp lại trong vòng 3 min sau khi bổ sung thuốc thử tạo dẫn xuất (4.19).

Hệ số biến thiên lặp lại của các lần bơm HPLC đối với FB₁ và FB₂ phải nhỏ hơn 5 % tính trên 10 lần bơm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp fumonisin số 3 đã tạo dẫn xuất (xem Bảng 1).

TCVN 9711:2013

7.5.3 Dung dịch mẫu thử

Bơm ví dụ 20 µl (nghĩa là 0,02 g mẫu thử) theo 7.4.2 vào hệ thống HPLC ở các thời điểm lặp lại trong vòng 3 min sau khi thêm thuốc thử tạo dẫn xuất (4.19).

7.5.4 Nhận biết

Nhận biết fumonisin B₁ và fumonisin B₂ bằng cách so sánh thời gian lưu của từng mẫu với thời gian lưu của dung dịch chuẩn.

Đôi khi có thể cần nhận biết pic fumonisin bằng cách bơm hỗn hợp dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn.

7.5.5 Xác định

Tiến hành xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả với đường chuẩn. Đối với phép xác định này, cần chuẩn bị dung dịch có nồng độ trong dải tuyến tính để thiết lập đường hồi quy tuyến tính của đường chuẩn.

Bơm các lượng bằng nhau của dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn để dựng đường chuẩn.

Nếu pic fumonisin thu được với dung dịch mẫu thử vượt quá điểm cao nhất của đường chuẩn, thì pha loãng dịch chiết mẫu bằng dung dịch axetonitril-nước (4.15) và lặp lại quá trình tạo dẫn xuất và xác định bằng HPLC.

CHÚ THÍCH 1 Việc tuân thủ thời điểm lặp lại giữa các lần bổ sung thuốc thử tạo dẫn xuất và giữa các lần bơm vào hệ thống HPLC là rất quan trọng do huỳnh quang của dẫn xuất fumonisin giảm nhanh sau thời gian quá 3 min.

CHÚ THÍCH 2 Giới hạn phát hiện và định lượng thay đổi đáng kể theo độ nhạy của detector được sử dụng. Giới hạn định lượng 50 µg/kg đối với FB₁ và FB₂ có thể thu được với detector thông dụng nhất, dựa trên tín hiệu/nhiều bằng 6.

CHÚ THÍCH 3 Sắc đồ điển hình của mẫu bột ngô và bánh ngô bị nhiễm tự nhiên được nêu trong Phụ lục B.

8 Tính kết quả

Ghi lại khối lượng của fumonisin (m_a) tương ứng với sự phát huỳnh quang của dung dịch mẫu thử từ đường chuẩn, tính bằng nanogram.

Tính phần khối lượng của từng fumonisin trong mẫu, w_i , bằng microgam trên kilogam, sử dụng Công thức (1):

$$w_i = \frac{m_a \times V_t \times D}{W \times V_i} \quad (1)$$

Trong đó:

m_a là khối lượng của từng fumonisin trong dung dịch thử lỏng được bơm vào cột HPLC, tính bằng nanogram (ng);

V_i là thể tích của dung dịch được tạo dẫn xuất, tính bằng microlit ($V_i = 100 \mu\text{l}$);

D là hệ số pha loãng có thể cần sử dụng;

W là khối lượng tương đương của mẫu được tạo dẫn xuất, tính bằng gam ($W = 0,1 \text{ g}$ trong $50 \mu\text{l}$ dung dịch mẫu thử);

V_i là thể tích bơm, tính bằng microlit ($V_i = 20 \mu\text{l}$).

9 Độ chụm

9.1 Yêu cầu chung

Chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị được lấy từ các phép thử liên phòng thử nghiệm có thể không áp dụng để phân tích dải nồng độ và chất nền khác ngoài dải nồng độ và chất nền đã cho trong Phụ lục.

9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được từ hai phép thử riêng rẽ, trên vật liệu thử giống hệt nhau do cùng một người tiến hành, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, trong trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại, r , không lớn hơn 5 % trong các trường hợp.

Các giá trị đối với fumonisin B₁ trong bột ngô là:

$$\bar{x} = 369 \mu\text{g/kg} \quad r = 249 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 646 \mu\text{g/kg} \quad r = 381 \mu\text{g/kg} \text{ (mẫu thêm chuẩn)}$$

$$\bar{x} = 780 \mu\text{g/kg} \quad r = 412 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 1414 \mu\text{g/kg} \quad r = 792 \mu\text{g/kg}$$

Các giá trị đối với fumonisin B₂ trong bột ngô là:

$$\bar{x} = 90 \mu\text{g/kg} \quad r = 56 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 203 \mu\text{g/kg} \quad r = 148 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 295 \mu\text{g/kg} \quad r = 154 \mu\text{g/kg} \text{ (mẫu thêm chuẩn)}$$

TCVN 9711:2013

$$\bar{x} = 558 \mu\text{g/kg} \quad r = 350 \mu\text{g/kg}$$

Các giá trị đối với fumonisin B₁ trong bánh ngô là:

$$\bar{x} = 323 \mu\text{g/kg} \quad r = 188 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 565 \mu\text{g/kg} \quad r = 238 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 922 \mu\text{g/kg} \quad r = 238 \mu\text{g/kg} \text{ (mẫu thêm chuẩn)}$$

$$\bar{x} = 1046 \mu\text{g/kg} \quad r = 325 \mu\text{g/kg}$$

Các giá trị đối với fumonisin B₂ trong bánh ngô là:

$$\bar{x} = 128 \mu\text{g/kg} \quad r = 78 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 237 \mu\text{g/kg} \quad r = 98 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 392 \mu\text{g/kg} \quad r = 84 \mu\text{g/kg} \text{ (mẫu thêm chuẩn)}$$

$$\bar{x} = 457 \mu\text{g/kg} \quad r = 134 \mu\text{g/kg}$$

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được của phép thử riêng rẽ trên mẫu thử giống hệt nhau, trong hai phòng thử nghiệm khác nhau, trong trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập, R , không lớn hơn 5 % trong các trường hợp.

Các giá trị đối với fumonisin B₁ trong bột ngô là:

$$\bar{x} = 369 \mu\text{g/kg} \quad R = 291 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 646 \mu\text{g/kg} \quad R = 459 \mu\text{g/kg} \text{ (mẫu thêm chuẩn)}$$

$$\bar{x} = 780 \mu\text{g/kg} \quad R = 557 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 1414 \mu\text{g/kg} \quad R = 868 \mu\text{g/kg}$$

Các giá trị đối với fumonisin B₂ trong bột ngô là:

$$\bar{x} = 90 \mu\text{g/kg} \quad R = 56 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 203 \mu\text{g/kg} \quad R = 168 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 295 \mu\text{g/kg} \quad R = 188 \mu\text{g/kg} \text{ (mẫu thêm chuẩn)}$$

$$\bar{x} = 558 \mu\text{g/kg} \quad R = 403 \mu\text{g/kg}$$

Các giá trị đối với fumonisin B₁ trong bánh ngô là:

\bar{x} = 323 µg/kg	R = 288 µg/kg
\bar{x} = 565 µg/kg	R = 440 µg/kg
\bar{x} = 922 µg/kg	R = 762 µg/kg (mẫu thêm chuẩn)
\bar{x} = 1046 µg/kg	R = 804 µg/kg

Các giá trị đối với fumonisin B₂ trong bánh ngô là:

\bar{x} = 128 µg/kg	R = 123 µg/kg
\bar{x} = 237 µg/kg	R = 182 µg/kg
\bar{x} = 392 µg/kg	R = 339 µg/kg (mẫu thêm chuẩn)
\bar{x} = 457 µg/kg	R = 333 µg/kg

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải gồm các dữ liệu sau:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết về mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc của mẫu, tên mẫu);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và loại quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả thử và đơn vị biểu thị kết quả
- độ lặp lại nếu được kiểm tra;
- mọi điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Các dữ liệu sau đây thu được từ một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm do Chương trình Tiêu chuẩn, Đo lường và Thử nghiệm của Cộng đồng châu Âu tổ chức theo Hướng dẫn của AOAC về quy trình nghiên cứu cộng tác để đánh giá xác nhận tính đặc thù của phương pháp phân tích [4].

Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm đối với bột ngô

Bột ngô	Fumonisin B ₁					Fumonisin B ₂				
	Trắng	Thêm chuẩn 800 µg/kg	Nhiễm tự nhiên ở mức thấp	Nhiễm tự nhiên ở mức trung bình	Nhiễm tự nhiên ở mức cao	Trắng	Thêm chuẩn 400 µg/kg	Nhiễm tự nhiên ở mức thấp	Nhiễm tự nhiên ở mức trung bình	Nhiễm tự nhiên ở mức cao
Năm tiến hành	2000					2000				
Số phòng thử nghiệm	21 ^a					21 ^a				
Số phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	21	21	21	20	21	21	21	17	21	21
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0
Số kết quả chấp nhận được	42	42	42	40	42	42	42	34	42	42
Giá trị trung bình (µg/kg)	41	646	369	780	1414	7	295	90	203	558
Độ lệch chuẩn lặp lại (s _r), (µg/kg)	- ^b	136	89	147	283	- ^b	55	20	54	125
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (RSD _r), (%)	- ^b	21,1	24,2	18,8	20,0	- ^b	18,5	22,0	26,8	22,5
Giới hạn lặp lại r (r = 2,8 x s _r), (µg/kg)	- ^b	381	249	412	792	- ^b	154	56	148	350
Độ lệch chuẩn tái lập (s _R), (µg/kg)	- ^b	164	104	199	310	- ^b	67	20	60	144
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (RSD _R), (%)	- ^b	25,7	28,2	25,5	21,9	- ^b	22,6	22,1	29,7	25,9
Giới hạn tái lập R (R = 2,8 x s _R), (µg/kg)	- ^b	459	291	557	868	- ^b	188	56	168	403
Độ thu hồi, (%)	- ^b	75,6	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b	72,0	- ^b	- ^b	- ^b

^a 2 phòng thử nghiệm trong số 23 phòng tham gia bị loại do kết quả bị đánh giá là sai.
^b Không thể áp dụng.

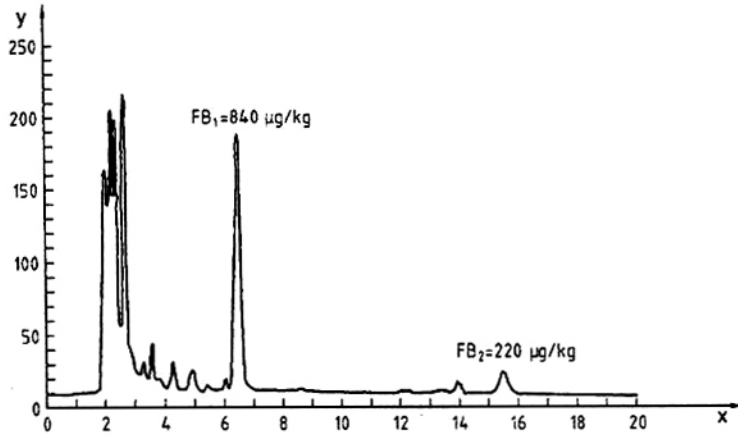
Bảng A.2 – Dữ liệu độ chụm đối với bánh ngô

Bột ngô	Fumonisin B ₁					Fumonisin B ₂				
	Trắng	Thêm chuẩn 800 µg/kg	Nhiễm tự nhiên ở mức thấp	Nhiễm tự nhiên ở mức trung bình	Nhiễm tự nhiên ở mức cao	Trắng	Thêm chuẩn 400 µg/kg	Nhiễm tự nhiên ở mức thấp	Nhiễm tự nhiên ở mức trung bình	Nhiễm tự nhiên ở mức cao
Năm tiến hành	2000					2000				
Số phòng thử nghiệm	21 ^a					21 ^a				
Số phòng thử nghiệm giữ lại sau khi trừ ngoại lệ	21	20	20	21	21	21	20	21	21	21
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Số kết quả chấp nhận được	42	40	40	42	42	42	40	42	42	42
Giá trị trung bình (µg/kg)	42	922	323	565	1046	4	392	128	237	457
Độ lệch chuẩn lặp lại (s _r), (µg/kg)	- ^b	85	67	85	116	- ^b	30	28	35	48
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (RSD _r), (%)	- ^b	9,2	20,6	15,0	11,1	- ^b	7,7	21,7	14,6	10,4
Giới hạn lặp lại r (r = 2,8 x s _r), (µg/kg)	- ^b	238	188	238	325	- ^b	84	78	98	134
Độ lệch chuẩn tái lập (s _R), (µg/kg)	- ^b	272	103	157	287	- ^b	121	44	65	119
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (RSD _R), (%)	- ^b	29,5	31,8	27,8	27,4	- ^b	30,9	34,8	27,5	26,1
Giới hạn tái lập R (R = 2,8 x s _R), (µg/kg)	- ^b	762	288	440	804	- ^b	339	123	182	333
Độ thu hồi, (%)	- ^b	110,0	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b	97,0	- ^b	- ^b	- ^b

^a 2 phòng thử nghiệm bị loại trong số 23 phòng tham gia, do kết quả bị đánh giá là sai.
^b Không thể áp dụng.

Phụ lục B
(Tham khảo)

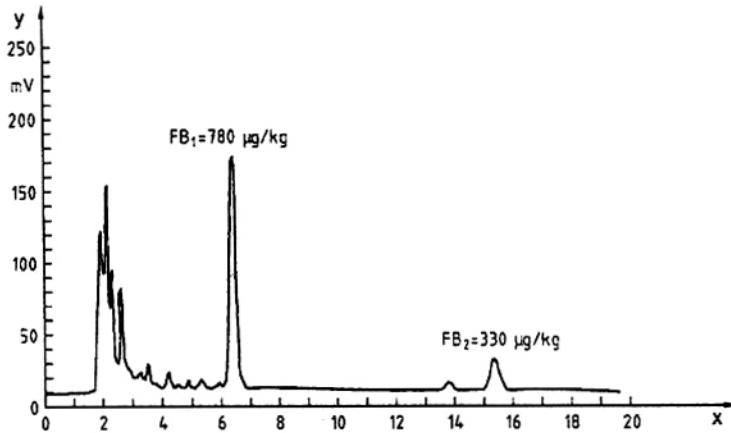
Sắc đồ điển hình



CHÚ DẪN

- x Thời gian (tính bằng phút)
- y Độ nhạy huỳnh quang (mV)

Hình B.1 – Sắc đồ điển hình của bánh ngô bị nhiễm tự nhiên



CHÚ DẪN

- x Thời gian (tính bằng phút)
- y Độ nhạy huỳnh quang (mV)

Hình B.2 – Sắc đồ điển hình của bột ngô bị nhiễm tự nhiên

Điều kiện vận hành: tạo dẫn xuất trước cột, 50 µl dịch chiết đã tinh sạch + 50 µl thuốc thử OPA; thể tích bơm: 20 µl (tương đương với 20 mg mẫu); cột Discovery® C₁₈¹⁾ (đường kính trong 150 x 4,6 mm); pha động đệm metanol-phosphat (77 + 23, phần thể tích, pH 3,35), tốc độ dòng 1 ml/min; detector huỳnh quang có bước sóng kích thích 335 nm và bước sóng phát xạ 440 nm.

¹⁾ Discovery® C₁₈ là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A., 2001., Determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn flakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity column-clean-up: collaborative study. *Journal of AOAC International* 84, p, 1828 – 1837.
 - [2] Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A., 2001., Determination of fumonisin at levels of interest for future EU Legislation: development of an analytical method and interlaboratory validation for maize flour and cornflakes. EU Final Report (European Commission, DG Science, Research and Development, Brussels, Belgium), EUR 19451.
 - [3] Solfrizzo M., De Girolamo A., Visconti A., 2001, Determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn flakes by HPLC and immunoaffinity clean up. *Food Additives and Contaminants*, 18, p. 227-235.
 - [4] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies p. 23-51.
-