

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 4328-2 : 2011; TCVN 9109 : 2011; TCVN 9124 : 2011;
ISO 5983-2 : 2009 ISO 6867 : 2000
TCVN 9125 : 2011; TCVN 9126 : 2011; TCVN 9127 : 2011;
ISO 6866 : 1985 ISO 17375 : 2006 ISO 14797 : 1999
TCVN 9128 : 2011; TCVN 9129 : 2011; TCVN 9130 : 2011.
ISO 14939 : 2001 ISO 6655 : 1997 ISO 14902 : 2001
TCVN 9131 : 2011; TCVN 9132 : 2011.
ISO 6870 : 2002 ISO 7485 : 2000

Xuất bản lần 1

**TUYỂN TẬP TIÊU CHUẨN QUỐC GIA
VỀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
CÁC THÀNH PHẦN HÓA HỌC**

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

TCVN 4328-2 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 5983-2 : 2009;

TCVN 9124 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6867 : 2000;

TCVN 9125 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6866 : 1985;

TCVN 9126 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 17375 : 2006;

TCVN 9127 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14797 : 1999;

TCVN 9128 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14939 : 2001;

TCVN 9129 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6655 : 1997;

TCVN 9130 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14902 : 2001;

TCVN 9131 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6870 : 2002;

TCVN 9132 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 7485 : 2000.

TCVN 4328-2 : 2011; TCVN 9109:2010; TCVN 9124 : 2011 ÷ TCVN 9132 : 2011 do Cục Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thức ăn chăn nuôi – Xác định aflatoxin B₁

Animal feeding stuffs – Determination aflatoxin B₁

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định aflatoxin B₁ trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao có dẫn xuất sau cột.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho thức ăn chăn nuôi có hàm lượng chất béo lên đến 50 %.

Giới hạn định lượng của phương pháp này có thể nhỏ hơn 0,5 µg/kg đối với aflatoxin B₁ cho tỷ số tín hiệu trên nhiễu bằng 6.

CHÚ THÍCH Phương pháp này dựa trên Tài liệu tham khảo [1].

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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

Phần mẫu thử được chiết bằng dung môi (axeton/nước). Dịch chiết mẫu được lọc, pha loãng bằng nước hoặc muối đệm phosphat đến nồng độ dung môi quy định. Phần mẫu thử được đưa lên cột miễn dịch (IAC) có chứa các kháng thể đặc thù với aflatoxin B₁. Aflatoxin B₁ được loại ra khỏi IAC bằng metanol nguyên chất và sau đó được định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) có dẫn xuất sau cột (PCD) bao gồm cả quá trình brom hóa. Vết tạo dẫn xuất sau cột đạt được bằng điện hóa tạo brom hoặc bằng pyridinium hydrobromua perbromua (PBPB) sau đó được xác định bằng detector huỳnh quang.

4 Thuốc thử

Sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích, trừ khi có các quy định khác.

CẢNH BÁO – Phương pháp này có sử dụng các dịch lỏng dễ cháy có độc tính như axeton, metanol và axetonitril. Tránh tiếp xúc và để xa nguồn nhiệt, tia lửa hoặc ngọn lửa hở.

CHÚ THÍCH Các quy trình khử nhiễm các chất thải phòng thử nghiệm đã được Tổ chức Nghiên cứu Quốc tế về Ung thư (WHO) xây dựng và đánh giá xác nhận.

4.1 Nước, phù hợp với loại 3 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

4.2 Muối đệm phosphat (PBS), pH 7,4

PBS có thể được chuẩn bị từ kali clorua (0,20 g), kali dihydro phosphat (0,20 g), dinatri hydro phosphat khan (1,16 g) [hoặc dinatri hydro phosphat ngậm 12 phân tử nước (2,92 g)] và natri clorua (8,00 g) thêm vào 900 ml nước tinh sạch. Chỉnh pH đến 7,4 (bằng HCl 0,1 mol/l hoặc NaOH 0,1 mol/l một cách thích hợp) và pha loãng dung dịch đến 1,0 lít.

Cách khác, có thể sử dụng các viên muối đệm phosphat bán sẵn có tính chất tương đương.

PBS không bền với vi sinh vật do đó nên chuẩn bị mới ít nhất hàng tuần.

4.3 Pyridinium hydrobromua perbromua (PBPB, CAS: 39416-48-3)

Thuốc thử này không cần trong trường hợp sử dụng điện hóa tạo brom.

4.4 Kali bromua

Thuốc thử này không cần trong trường hợp sử dụng thuốc thử PBPB.

4.5 Axetonitril, để dùng cho HPLC.

4.6 Metanol, để dùng cho HPLC.

4.7 Axeton, tinh khiết.

4.8 Nước để dùng cho HPLC, phù hợp với loại 1 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

4.9 Dung môi chiết, dung dịch của axeton (4.7) và nước (4.8) [85+15 (tính theo thể tích)].

4.10 Axit nitric, $c(\text{HNO}_3) = 4 \text{ mol/l}$

Thuốc thử này không cần trong trường hợp sử dụng thuốc thử PBPB.

4.11 Cột ái lực miễn dịch (IAC)

IAC cần chứa các kháng thể kháng aflatoxin B₁. IAC cần có dung tích không nhỏ hơn 40 ng aflatoxin B₁ và phải cho độ thu hồi không nhỏ hơn 80 % đối với aflatoxin B₁ khi dùng cho dung dịch chuẩn chứa 0,25 ng aflatoxin B₁ trong axeton/nước.

4.12 Dung môi pha động A dùng cho HPLC, chỉ dùng cho thuốc thử sau cột có PBPB

Sử dụng dung dịch của nước (4.8)/axetonitril (4.5)/metanol (4.6) [6+2+3 (tính theo thể tích)]. Tỷ lệ của các dung môi có thể cần điều chỉnh để cho các thông số tách tối ưu.

4.13 Dung môi pha động B dùng cho HPLC, chỉ sử dụng với điện hóa tạo brom.

Sử dụng dung dịch nước (4.8)/axetonitril (4.5)/metanol (4.6) [6+2+3 (tính theo thể tích)] chứa 120 mg kali bromua (4.4) và 350 µl axit nitric ở nồng độ 4 mol/l (4.10) trên mỗi lít pha động. Tỷ lệ của các dung môi có thể cần điều chỉnh để cho các thông số tách tối ưu.

Các dung môi pha động (4.12 và 4.13) cần được khử khí.

4.14 Thuốc thử sau cột, chỉ dùng cho thuốc thử sau cột có PBPB

Hòa tan 25 mg PBPB (4.3) trong 500 ml nước. Dung dịch này có thể bền đến 4 ngày, nếu được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ phòng. Thuốc thử sau cột này chỉ được sử dụng khi kết hợp với dung môi pha động A dùng cho HPLC (4.12) nhưng không kết hợp với dung môi pha động B dùng cho HPLC (4.13).

CHÚ THÍCH Thuốc thử sau cột chỉ bền trong 3 ngày.

4.15 Toluene/axetonitril, 98 + 2 (tính theo thể tích).**4.16 Chất chuẩn aflatoxin B₁, dạng tinh thể hoặc màng khô dùng cho phân tích**

CẢNH BÁO 1 – Phương pháp này có sử dụng các dung dịch aflatoxin B₁. Aflatoxin là chất gây ung thư cho người. Chú ý lời cảnh báo của Tổ chức quốc tế về nghiên cứu ung thư (WHO)^[2].

CẢNH BÁO 2 – Aflatoxin dễ bị suy giảm chất lượng dưới ánh sáng. Thực hiện phân tích tránh ánh sáng ban ngày và giữ các dung dịch chuẩn aflatoxin tránh ánh sáng bằng cách dùng các lọ nhỏ màu nâu hoặc giấy nhôm.

4.17 Dung dịch gốc hiệu chuẩn dùng cho HPLC**4.17.1 Dung dịch gốc dùng cho mục đích chung**

Chuẩn bị dung dịch gốc aflatoxin B₁ (4.16) chứa 10,0 µg/ml trong toluen/axetonitril (4.15).

CHÚ THÍCH Dung dịch gốc trong toluen/axetonitril bền trong ít nhất một năm với điều kiện được bảo quản bằng dụng cụ thủy

TCVN 9126:2011

tin đã rửa axit và được bảo quản nơi tối ở -18 °C. Nếu dung dịch gốc được dùng trong khoảng thời gian ngắn hơn nhiều (tối đa 3 tháng), thì có thể sử dụng metanol (4.6) để thay thế. Chú ý rằng dung dịch trong metanol nhạy hơn với môi trường kiềm của bề mặt thủy tinh và ánh sáng ban ngày so với dung dịch toluen/axetonitril.

Bọc kín các bình bằng lá nhôm và bảo quản chúng ở nhiệt độ dưới 4 °C. Để xác định chính xác nồng độ aflatoxin trong dung dịch gốc này, thì ghi lại đường hấp thụ ở bước sóng từ 330 nm đến 370 nm trong cuvet thủy tinh thạch anh có chiều dài đường quang 1 cm (5.21) trong máy đo phổ (5.20), với dung môi của dung dịch gốc trong cuvet so sánh. Tính nồng độ khối lượng của từng aflatoxin, c_a , bằng microgam trên millilit, dùng công thức (1):

$$c_a = A_{\max} \times \frac{M_a \times 100}{\epsilon_a \times d} \quad (1)$$

trong đó

A_{\max} là độ hấp thụ xác định được ở mức tối đa của đường hấp thụ;

M_a là khối lượng phân tử của aflatoxin B₁, tính bằng gam trên mol (312 g/mol);

ϵ_a là độ hấp thụ phân tử của aflatoxin B₁, tính bằng mét vuông trên mol (1 930 m²/mol đối với dung dịch toluen/axetonitril và 2 150 m²/mol đối với dung dịch metanol);

d là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng xentimet.

4.17.2 Dung dịch gốc hiệu chuẩn

Từ dung dịch gốc (4.17.1), chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B₁ (4.16) chứa 50,0 ng/ml trong toluen/axetonitril (4.15) hoặc trong metanol (4.6)

4.17.3 Phương án tùy chọn A (xem 6.3)

Từ dung dịch gốc hiệu chuẩn (4.17.2), dùng pipet lấy các thể tích được nêu trong Bảng 1 (phương án tùy chọn A) cho vào dãy các bình định mức 20 ml đã được hiệu chuẩn. Làm bay hơi dung dịch toluen/axetonitril vừa đến khô dưới dòng nitơ ở nhiệt độ phòng. Nếu sử dụng metanol để chuẩn bị dung dịch gốc, thì không cần làm bay hơi. Thêm 7 ml metanol vào mỗi bình. Để cho aflatoxin hòa tan, sau đó pha loãng bằng nước đến vạch rồi lắc kỹ.

CHÚ THÍCH Metanol và nước bị giảm thể tích khi trộn.

4.17.4 Phương án tùy chọn B (xem 6.3)

Từ dung dịch gốc hiệu chuẩn (4.17.2), dùng pipet lấy các thể tích được nêu trong Bảng 1 (phương án tùy chọn B) cho vào ít nhất 5 bình định mức khác nhau dung tích 20 ml. Làm bay hơi dung dịch toluen/axetonitril vừa đến khô dưới dòng nitơ ở nhiệt độ phòng. Nếu sử dụng metanol để chuẩn bị dung

dịch gốc, thì không cần làm bay hơi. Thêm khoảng 10 ml metanol vào mỗi bình. Để aflatoxin hòa tan, rồi pha loãng thêm với metanol nguyên chất (không dùng hỗn hợp metanol/nước) đến vạch rồi lắc kỹ. Sau đó chuyển chính xác 1 ml dung dịch làm việc hiệu chuẩn này vào lọ nhỏ thủy tinh đã rửa bằng axit (xem Cảnh báo trong 5.7), làm bay hơi đến khô theo phương án tùy chọn B (6.3.3) rồi hòa tan lại trong một thể tích chính xác như được dùng để hòa tan lại mẫu trước khi bơm (6.3). Tính nồng độ aflatoxin B₁ trong dung dịch đã hòa tan và làm bay hơi, bằng nanogam trên mililit. Dùng các giá trị nồng độ này để tính theo 6.6. Trong trường hợp này, dải hiệu chuẩn giữ không thay đổi.

Bảng 1 – Chuẩn bị các dung dịch làm việc hiệu chuẩn

Các chuẩn làm việc	Phương án tùy chọn A		Phương án tùy chọn B	
	Dung dịch gốc hiệu chuẩn	Nồng độ của aflatoxin B ₁	Dung dịch gốc hiệu chuẩn	Nồng độ của aflatoxin B ₁
	μl	ng/ml	μl	ng/ml
1	20	0,050	100	0,250
2	70	1,175	350	0,875
3	120	0,300	600	1,500
4	170	0,425	850	2,125
5	220	0,550	1 100	2,750

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các thiết bị, dụng cụ sau đây:

- 5.1 **Máy lắc thẳng đứng hoặc máy lắc ngang**, có thể điều chỉnh được.
- 5.2 **Giấy lọc gấp nếp**, đường kính 24 cm (ví dụ xenluloza dùng cho kết tủa mịn).
- 5.3 **Bình nón**, có nắp vặn hoặc nắp thủy tinh.
- 5.4 **Giấy lọc sợi thủy tinh nhỏ**, đường kính 5 cm (ví dụ cỡ lỗ 1,6 μm).
- 5.5 **Bình chứa**, 75 ml có bộ phận kết nối đầu tip Luer dùng cho IAC.
- 5.6 **Bơm tay**, xyranh 20 ml có khóa Luer hoặc nắp cao su dùng cho IAC.
- 5.7 **Bình định mức**, dung tích 5 ml, 10 ml và 20 ml, có độ chính xác ít nhất 0,5 %.

TCVN 9126:2011

CẢNH BÁO – Việc sử dụng các dụng cụ thủy tinh không được rửa bằng axit (ví dụ: các lọ nhỏ, ống nghiệm, bình) dùng cho các dung dịch pha nước aflatoxin có thể làm thất thoát aflatoxin. Do đó, chú ý đặc biệt với dụng cụ thủy tinh mới sử dụng lần đầu. Vì vậy, trước khi sử dụng, ngâm các dụng cụ thủy tinh trong axit loãng (ví dụ: axit sulfuric, 2 mol/l) trong vài giờ, sau đó tráng rửa thêm bằng nước cất để loại bỏ hết axit (điều này có thể kiểm tra được bằng giấy pH).

5.8 Bơm dùng cho HPLC, thích hợp đối với tốc độ dòng ở $(1,000 \pm 0,005)$ ml/min.

5.9 Hệ thống bơm

Hệ thống bơm cần phù hợp cho việc bơm vòng (nên dùng van có vòng ít nhất 100 μ l). Phải đảm bảo độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của tín hiệu tích phân đối với việc bơm nhiều lần ($n = 10$) dung dịch chuẩn aflatoxin B₁ (nồng độ tương đương với mức nhiễm bẩn 1 μ g/kg) cho giá trị tối đa là 10 %. Các dữ liệu này phải được ghi lại.

5.10 Cột RP-HPLC, ví dụ LC-18 hoặc ODS-2 là tùy chọn, nhưng nên dùng tiền cột.

5.11 Hệ thống dẫn xuất sau cột có PBPB (thay thế cho 5.12), bao gồm:

- bơm không xung thứ cấp dùng cho HPLC,
- chi tiết T thể tích chết zero và
- ống phản ứng PTFE có đường kính trong tối thiểu 0,5 mm \times 45 cm.

Thời gian phản ứng phải ít nhất 4 s trước khi phát hiện.

5.12 Hệ thống dùng để tạo dẫn xuất sau cột HPLC với điện hóa sinh brom.

Thiết bị này cần được cài đặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để khẳng định hàm lượng aflatoxin B₁, cột HPLC phải được tháo ra khỏi dụng cụ brom hóa và phải được nối trực tiếp với detector huỳnh quang.

Không nên ngắt dòng điện khi các dụng cụ brom hóa vẫn đang hoạt động vì có khả năng brom vẫn còn trong màng cuvet của thiết bị.

5.13 Detector huỳnh quang, có bộ lọc bước sóng kích thích 360 nm và bộ lọc phát xạ ngừng hoạt động ở bước sóng lớn hơn 420 nm, hoặc loại tương đương.

Nên cài đặt các detector có thể điều chỉnh được là $E_x = 365$ nm, $E_m = 435$ nm, $BW = 18$ nm.

5.14 Bộ lọc dùng một lần (0,45 μ m), trước khi dùng cần chắc chắn rằng không thất thoát aflatoxin trong quá trình lọc (phép thử thu hồi) vì có thể các vật liệu lọc khác nhau có thể giữ lại aflatoxin B₁.

5.15 Pipet một vạch, dung tích 1 ml, 2 ml, 5 ml và 10 ml.

- 5.16 **Cân phân tích**, có khả năng cân chính xác đến 0,1 mg.
- 5.17 **Cân phòng thử nghiệm**, có khả năng cân chính xác đến 0,01 g.
- 5.18 **Xyranh microlit hoặc pipet microlit đã hiệu chuẩn**, dung tích 20 μ l đến 500 μ l.
- 5.19 **Thiết bị làm bay hơi**, tùy chọn, chỉ cần phương án tùy chọn B (6.3.3).
- 5.20 **Máy đo quang phổ**.
- 5.21 **Cuvet thủy tinh thạch anh**, chiều dài đường quang 1 cm.

6 Cách tiến hành

6.1 Bảo ôn IAC

IAC (4.11) phải ở nhiệt độ phòng trước khi bảo ôn. Bảo ôn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nếu không quy định, thì cho 10 ml PBS (4.2) lên đỉnh IAC và cho đi qua IAC (theo trọng lực) với tốc độ 2 ml/min đến 3 ml/min. Đảm bảo rằng một phần nhỏ (0,5 ml) PBS vẫn còn trên IAC cho đến khi nạp dung dịch mẫu.

6.2 Chiết

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử, chính xác đến 0,1 g cho vào bình nón 500 ml có nắp vận hoặc nắp thủy tinh. Thêm 250 ml dung môi chiết axeton/nước (4.9). Đầu tiên lắc mạnh 15 s đến 30 s bằng tay, sau đó lắc 30 min bằng máy lắc (5.1). Lọc dịch chiết bằng giấy lọc gấp nếp (5.2). Dùng pipet (5.15) lấy 5,0 ml dịch lọc trong cho vào bình định mức 100 ml (5.7) và pha loãng đến vạch bằng PBS hoặc nước. Dung môi pha loãng (PBS hoặc nước) phải được chọn theo quy định của nhà sản xuất IAC. Nếu không quy định, thì dùng dung môi pha loãng PBS. Nếu dung dịch không trong, thì lọc lại qua bộ lọc bằng sợi thủy tinh (5.4) và cho chính xác 50 ml dịch lọc trong bình chứa vào IAC đã bảo ôn. (Nếu dung dịch đã trong, thì dung dịch pha loãng này có thể đưa trực tiếp lên IAC). Đưa dung dịch lên IAC như mô tả trong 6.3.1.

6.3 Làm sạch bằng ái lực miễn dịch

6.3.1 Yêu cầu chung

Các phương pháp bảo ôn, nạp, rửa và rửa giải có sự hơi khác nhau giữa các nhà sản xuất IAC do đó các hướng dẫn cụ thể áp dụng cho IAC cần tuân thủ nghiêm ngặt. Thông thường, các quy trình bao gồm chiết mẫu bằng metanol/nước, lọc hoặc ly tâm, pha loãng mẫu bằng PBS hoặc nước, nạp lên IAC dưới áp suất (có thể rửa sơ bộ), rửa IAC bằng nước cất và rửa giải aflatoxin B₁ bằng metanol hoặc axetonitril.

Cho dịch lọc đi qua IAC với tốc độ dòng khoảng 1 giọt mỗi giây (khoảng 3 ml/min) (bằng trọng lực). Tốc

TCVN 9126:2011

độ dòng không được quá 5 ml/min. Rửa IAC với khoảng 20 ml nước (4.8), nạp hai phần mẫu thử, mỗi phần khoảng 10 ml ở tốc độ dòng 3 ml/min. Làm khô từ 5 s đến 10 s trong điều kiện chân không nhẹ hoặc cho dòng khí đi qua IAC trong 10 s bằng xyranh.

Rửa giải aflatoxin B₁ theo quy trình hai bước:

- a) Nạp 0,50 ml metanol lên IAC và để cho aflatoxin B₁ đi qua IAC bằng trọng lực. Thu lấy dịch rửa giải vào bình định mức 5 ml (5.7)
- b) Đợi 1 min rồi nạp phần 1,25 ml metanol thứ hai. Thu lấy phần lớn dung môi rửa giải bằng cách nén không khí, sau khi hầu hết dịch rửa giải đã đi qua IAC bằng trọng lực.

6.3.2 Phương án tùy chọn A (nên dùng)

CHÚ THÍCH Nên dùng phương án này, nhưng cần có detector huỳnh quang và hệ thống bơm thích hợp (xem thêm 5.9). Phương án tùy chọn B chỉ áp dụng nếu tín hiệu detector không đủ lớn để phân tích theo phương án tùy chọn A.

Thu lấy dịch rửa giải vào bình định mức 5 ml (5.7). Làm đầy bằng nước và lắc kỹ (thể tích cuối cùng theo 6.6). Nếu dung dịch trong, thì có thể dùng trực tiếp để phân tích HPLC. Nếu dung dịch không trong, thì lọc dung dịch qua giấy lọc dùng một lần (cỡ lỗ 0,45 μm) (5.14) trước khi bơm vào HPLC. Dùng vòng bơm mẫu để đảm bảo độ chính xác tối đa. Tùy thuộc vào hệ thống bơm, (ví dụ xyranh hoặc bộ lấy mẫu tự động) mà lấy thể tích mẫu gấp ba lần cỡ vòng bơm và bơm ít nhất ít nhất hai phần ba thể tích này vào van, để đảm bảo rằng phân đoạn giữa vẫn còn trong vòng bơm. Như vậy, vòng được tráng rửa bằng dung môi bơm trong khi dung môi trong van còn lại vẫn đủ.

6.3.3 Phương án tùy chọn B (chỉ áp dụng nếu có thể)

Nếu tín hiệu detector không đủ để đảm bảo độ lệch chuẩn tương đối (xem 5.9) được yêu cầu, thì có thể gồm có thêm bước làm bay hơi để thỏa mãn độ lệch chuẩn tương đối được yêu cầu.

Thu lấy dịch rửa giải metanol có chứa aflatoxin từ cột IAC vào lọ thủy tinh nhỏ đã rửa sạch axit (xem Cảnh báo trong 5.7). Làm bay hơi dịch rửa giải đến khô dưới dòng nitơ nhẹ ở 40 °C ± 5 °C. Hòa tan lại aflatoxin trong dung dịch metanol trong nước (MeOH 35 %). Sử dụng chính xác một thể tích dùng cho phần mẫu còn lại sau khi bay hơi như đã dùng đối với dung dịch hiệu chuẩn còn lại sau khi làm bay hơi (4.17). Thể tích dùng để hòa tan lại (thể tích cuối cùng theo 6.6) sẽ tùy thuộc vào cỡ vòng bơm. Sử dụng vòng bơm mẫu như trong phương án tùy chọn A.

6.4 Tạo dẫn xuất sau cột

Khi dùng PBPB, gắn chi tiết T vào ống phản ứng (xem 5.11) và sau đó vận hành với các thông số sau đây:

- a) tốc độ dòng:
 - 1,00 ml/min (pha động 4.12);

- 0,30 ml/min (thuốc thử 4.14).

Khi sử dụng điện hóa tạo brom, theo hướng dẫn của nhà sản xuất, cài đặt cuvet và vận hành các thông số sau đây:

a) tốc độ dòng:

- 1,00 ml/min (pha động 4.13);

b) dòng điện:

- 100 μ A.

6.5 Dụng cụ chuẩn

Để tính hồi quy tuyến tính, dùng phương pháp tính khoa học hoặc chương trình thống kê.

Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách dùng dung dịch chuẩn làm việc trong 4.17. Các dung dịch này phải bao trùm trong dải aflatoxin B₁ từ 0,5 μ g/kg đến 5,5 μ g/kg. Dụng cụ chuẩn trước để phân tích theo Bảng 1 và kiểm tra đường tuyến tính. Nếu hàm lượng aflatoxin B₁ trong mẫu nằm ngoài dải hiệu chuẩn, thì đường chuẩn phải được chuẩn bị một cách thích hợp. Cách khác, dung dịch bơm dùng để phân tích HPLC có thể được pha loãng đến hàm lượng thích hợp của aflatoxin B₁ để thiết lập được đường chuẩn.

6.6 Tính toán

Vẽ các tín hiệu theo trục x (chiều cao hoặc diện tích) với nồng độ của aflatoxin B₁ (ng/ml) theo trục y. Xác định đường chuẩn từ dữ liệu này bằng cách sử dụng hồi quy tuyến tính. Dùng hàm kết quả để tính nồng độ aflatoxin B₁ trong dung dịch đã đo (ng/ml) từ mẫu thử:

$$y = ax + b$$

Từ đường chuẩn (hàm số), tính nồng độ aflatoxin của các dung dịch bơm thu được bằng hồi quy tuyến tính.

$$\rho = a \times A + b$$

$$w_{c-} = \frac{\rho \times V_s \times V_E \times V_D}{m \times V_{ext} \times V_{clean}}$$

$$w_{c-} = \frac{\rho \times 100 \times V_E}{m}$$

m là khối lượng mẫu được lấy để phân tích, tính bằng gam (50 g);

V_s là thể tích dung môi được lấy để chiết, tính bằng mililit (250 ml);

TCVN 9126:2011

- V_{ext} là thể tích pha nước được lấy từ dịch chiết, tính bằng mililit (5 ml);
- V_D là thể tích đạt được sau khi pha loãng bằng PBS (nước), tính bằng mililit (100 ml);
- V_{clean} là thể tích của pha loãng được lấy để làm sạch miễn dịch, tính bằng mililit (50 ml);
- V_E là thể tích cuối cùng đạt được sau khi rửa giải từ IAC, tính bằng mililit;
- ρ là nồng độ aflatoxin được tính từ hồi quy tuyến tính, tính bằng nanogram trên mililit (ml);
- w_c là phần mẫu có nhiễm aflatoxin B₁, tính bằng microgam trên kilogram;
- A là diện tích hoặc chiều cao pic aflatoxin thu được từ các dung dịch đo.

Lưu ý, cần bơm cùng một thể tích mẫu và các dung dịch chuẩn để phù hợp với công thức.

6.7 Quy trình thêm chuẩn (spiking) để xác định độ thu hồi

Đối với phép xác định độ thu hồi, quy trình thêm chuẩn phải được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch gốc aflatoxin B₁ trong metanol. Mức thêm chuẩn phải nằm trong dải hiệu chuẩn (tốt nhất là lấy giá trị trung bình). Lấy cẩn thận không quá 2 ml dung môi thêm chuẩn (dung dịch phải đủ nồng độ aflatoxin B₁) và sau đó làm bay hơi ở nơi tối và nên kéo dài từ 0,5 h đến 2 h.

7 Độ chụm

7.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử nghiên cứu liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và các chất nền đã nêu.

7.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r :

- $\bar{x} = 1,33 \mu\text{g/kg}$ $r = 0,22 \mu\text{g/kg}$ (bổ sung chuẩn);
- $\bar{x} = 3,89 \mu\text{g/kg}$ $r = 0,69 \mu\text{g/kg}$ (bổ sung chuẩn);
- $\bar{x} = 0,54 \mu\text{g/kg}$ $r = 0,11 \mu\text{g/kg}$ (nhiễm tự nhiên);
- $\bar{x} = 0,87 \mu\text{g/kg}$ $r = 0,21 \mu\text{g/kg}$ (nhiễm tự nhiên);
- $\bar{x} = 4,19 \mu\text{g/kg}$ $r = 0,72 \mu\text{g/kg}$ (nhiễm tự nhiên).

7.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau do hai phòng thử nghiệm khác nhau thực hiện, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R :

- $\bar{x} = 1,33 \mu\text{g/kg}$ $R = 0,72 \mu\text{g/kg}$ (bổ sung chuẩn);
- $\bar{x} = 3,89 \mu\text{g/kg}$ $R = 1,87 \mu\text{g/kg}$ (bổ sung chuẩn);
- $\bar{x} = 0,54 \mu\text{g/kg}$ $R = 0,27 \mu\text{g/kg}$ (nhiễm tự nhiên);
- $\bar{x} = 0,87 \mu\text{g/kg}$ $R = 0,47 \mu\text{g/kg}$ (nhiễm tự nhiên);
- $\bar{x} = 4,19 \mu\text{g/kg}$ $R = 2,30 \mu\text{g/kg}$ (nhiễm tự nhiên).

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chứa ít nhất các dữ liệu sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- b) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về chất hiệu chuẩn;
- c) kết quả thử nghiệm và các đơn vị mà kết quả biểu thị;
- d) ngày thử nghiệm;
- e) các điểm cụ thể quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- f) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;

Phụ lục A

(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Phép thử cộng tác quốc tế gồm 21 phòng thử nghiệm ở 14 quốc gia đã thực hiện trên 5 mẫu thức ăn hỗn hợp cho trâu bò bao gồm các thành phần sau đây với số lượng giảm dần: gluten ngô, vỏ đậu tương, hạt ngũ cốc (lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen), chiết xuất mía đường và củ cải đường, củi chanh, chiết xuất hoa hướng dương, đậu nành, ngô, cỏ, ri đường, canxi clorua, natri clorua, premix vitamin và premix vi khoáng. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách trộn các thành phần thức ăn chăn nuôi ở trên (không kể lúa mì và ngô) với lúa mì và ngô chứa aflatoxin B₁ khoảng 0,15 µg/kg.

Phép thử do Trung tâm nghiên cứu phối hợp với Viện nghiên cứu vật liệu chuẩn và Đo lường, Geel, Bỉ, công nhận vào năm 1999 (xem tài liệu tham khảo [5]), các kết quả thu được được phân tích thống kê theo quy tắc đã hài hòa của Hiệp hội hóa học thuần túy và ứng dụng quốc tế (IUPAC).

Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm

	Mẫu trắng	Mẫu thêm chuẩn có aflatoxin B ₁		Chất nhiễm tự nhiên có aflatoxin B ₁		
		µg/kg		µg/kg		
		1,2 ^a	3,6 ^a	0,5 ^b	1,0 ^b	5 ^b
Số lượng các phòng thử nghiệm tham gia	21	21	21	21	21	21
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi đã loại trừ ngoại lệ	0	1	1	3	2	3
Số lượng các kết quả thử nghiệm từ các phòng thử nghiệm còn lại	21	20	20	18	19	18
Giá trị trung bình, \bar{x} , µg/kg	< 0,02	1,33	3,89	0,54	0,87	4,19
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , µg/g		0,08	0,25	0,04	0,08	0,26
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %		5,9	6,4	7,2	8,7	6,2
Giới hạn lặp lại $r(=2,8s_r)$, µg/g		0,22	0,69	0,11	0,21	0,72
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , µg/g		0,26	0,67	0,10	0,17	0,82
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %		19,4	17,5	17,9	19,4	19,6
Giới hạn tái lập $R(=2,8 \times s_R)$, µg/g		0,72	1,87	0,27	0,47	2,30
Giá trị Horrat ^c		0,45	0,47	0,36	0,4	0,54
Độ thu hồi		110,8	108,1	n.a.	n.a.	n.a.

^a Các mức này thu được bằng cách bổ sung chuẩn của mẫu trắng mà chưa biết dung dịch chuẩn (đã mã hóa).

^b Các mức này là mức mục tiêu (tốt nhất ước tính) trong quá trình tạo mẫu thử để thử nghiệm.

^c Do các giá trị này thấp hơn 1,5, vì vậy không thực sự ảnh hưởng đến việc áp dụng hoặc hiệu lực của phương pháp.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] WERNER, G., Bestimmung der Aflatoxine in Futtermitteln nach selektiver Reinigung an einer Immunoaffinitätsäule. *Agribiological Research*, **44** (4), 1991, pp. 289-298
- [2] Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ 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 (WHO), Lyon (France), 1980, p. 59.
- [3] 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 Scientific publication No. 113*, International Agency for Research on Cancer (WHO), Lyon (France), 1991, p. 63
- [4] *Methodenbuch Band III*, Erg. 1997, Sec. 16.1.4. VDLUFA-Verlag Darmstadt, Germany
- [5] STROKA, J., REUTTER, M., VON HOLST, C. and ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for the determination of aflatoxin B₁ in cattle feed. *JAOAC*, **86** (6), 2003, pp. 1179-1186
- [6] NESHEIM, S., TRUCKSESS, M.W. and PAGE, S.W. Molar Absorptivities of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Axetonitrile, Methanol and Toluene-Axetonitrile (9+1) (Modification of AOAC Official Method 971.22): Collaborative Study. *JAOAC*, **82** (2), 1991, pp. 251-258.
-