

## Lời nói đầu

TCVN 8162 : 2009 hoàn toàn tương đương với EN 13585 : 2001;

TCVN 8162 : 2009 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm và Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

# Thực phẩm – Xác định fumonisin B<sub>1</sub> và B<sub>2</sub> trong ngô –

## Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có làm sạch bằng chiết pha rắn

*Foodstuffs – Determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in maize – High performance liquid chromatographic (HPLC) method with solid phase extraction clean-up*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) và fumonisin B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) trong ngô bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Phương pháp này đã được khảo nghiệm thành công trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm theo các hướng dẫn của AOAC về nghiên cứu cộng tác [1] trên ngô chứa 405 µg/kg đến 6732 µg/kg fumonisin B<sub>1</sub> và 152 µg/kg đến 2619 µg/kg fumonisin B<sub>2</sub>. Phương pháp này có thể áp dụng tốt cho ngô và ngô đã sơ chế (ví dụ: ngô tươi, ngô khô và bột ngô), nhưng không cho các kết quả đáng tin cậy đối với phần lớn các sản phẩm chế biến từ ngô.

### 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 (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 ra khỏi mẫu ngô bằng hỗn hợp metanol và nước. Dịch chiết đã lọc được tinh sạch trên ống chiết pha rắn (SPE) trao đổi anion mạnh (SAX) và fumonisin được rửa giải bằng hỗn hợp axit axetic và metanol. Dịch chiết được làm bay hơi và cặn được hoà tan lại trong metanol và o-phthalialdehyd/2-mercaptoethanol (OPA/MCE) được bổ sung để tạo thành các dẫn xuất fumonisin huỳnh quang. Các dẫn xuất này được phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo có detector huỳnh quang.

**CẢNH BÁO** Fumonisin gây độc cho gan, ảnh hưởng đến thần kinh và gây ung thư cho chuột. Các ảnh hưởng đối với người chưa được nghiên cứu đầy đủ. Cần tuân thủ các cảnh báo an toàn khi xử lý với fumonisin. Khi bị rót ra phòng thử nghiệm thì phải được rửa sạch bằng dung dịch natri hypoclorit 5 %.

## 4 Thuốc thử và vật liệu thử

### 4.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại phân tích và nước loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có qui định khác. Dung môi phải có chất lượng dùng cho HPLC.

### 4.2 Metanol, tuyệt đối.

### 4.3 Dung dịch metanol, phần thể tích $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 75 \%$ .

Trộn 75 phần thể tích metanol (4.2) với 25 phần thể tích nước.

### 4.4 Dung dịch axetonitril, $\varphi(\text{CH}_3\text{CN}) = 50 \%$ .

Trộn 50 phần thể tích axetonitril với 50 phần thể tích nước.

### 4.5 Axit o-phosphoric, $\varphi(\text{H}_3\text{PO}_4) = 85 \%$ .

### 4.6 Dung dịch metanol-axit axetic, $\varphi(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1 \%$ để rửa giải cột SPE.

Trộn 1 phần thể tích axit axetic băng với 99 phần thể tích metanol (4.2).

### 4.7 o-phthaldialdehyd (OPA).

### 4.8 2-mercaptoethanol (MCE).

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

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

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

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

### 4.11 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .

Hoà tan 0,4 g NaOH trong 100 ml nước.

## 4.12 Pha động

Trộn 77 phần thể tích metanol (4.2) với 23 phần thể tích dung dịch natri dihydro phosphat (4.9). Chỉnh pH đến 3,35 bằng axit o-phosphoric (4.5). Lọc dung dịch qua bộ lọc màng 0,45  $\mu\text{m}$  (5.7).

Thành phần của pha động có thể phải điều chỉnh để phù hợp với các đặc trưng của cột HPLC riêng rẽ.

## 4.13 Thuốc thử tạo dẫn xuất

Hoà tan 40 mg OPA (4.7) trong 1 ml metanol (4.2) và pha loãng bằng 5 ml dung dịch dinatri tetraborat (4.10). Thêm 50  $\mu\text{l}$  MCE (4.8) và trộn. Khi dung dịch này được bảo quản trong lọ hổ phách kín, để ở nơi tối, ở nhiệt độ phòng, có thể bền đến 1 tuần.

## 4.14 Dung dịch chuẩn FB<sub>1</sub> và FB<sub>2</sub>

Chuẩn bị các dung dịch gốc FB<sub>1</sub> và FB<sub>2</sub> riêng rẽ ở các nồng độ 250  $\mu\text{g/ml}$  trong dung dịch axetonitril (4.4). Có thể sử dụng các dung dịch có bán sẵn. Lấy các lượng 100  $\mu\text{l}$  của từng dung dịch gốc cho vào lọ thuỷ tinh và thêm 300  $\mu\text{l}$  dung dịch axetonitril để có 500  $\mu\text{l}$  dung dịch chuẩn có chứa cả hai fumonisin ở nồng độ riêng rẽ là 50  $\mu\text{g/ml}$ . Nếu cần dụng đường chuẩn, thì trộn các lượng khác nhau của các dung dịch chuẩn (nghĩa là 20  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  và 200  $\mu\text{l}$ ) của từng fumonisin và pha loãng đến 500  $\mu\text{l}$  bằng dung dịch axetonitril để thu được các dung dịch hiệu chuẩn tương ứng.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4 °C thì các dung dịch chuẩn fumonisin có thể bền được ít nhất 6 tháng.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị và dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

### 5.1 Thiết bị HPLC, gồm:

**5.1.1 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao**, có bơm đẳng dòng để phân phối ví dụ: tốc độ dòng không đổi 1 ml/min, được trang bị hệ thống bơm có thể phân phối ví dụ: 10  $\mu\text{l}$ .

**5.1.2 Cột chiết pha đảo phân tích**, ví dụ: octyldecylsilan (ODS), đảm bảo tách đường nền của các pic fumonisin ra khỏi các pic khác, có các đặc tính sau:

- thép không gỉ;
- dài 150 mm;
- đường kính trong 4,6 mm;
- pha tĩnh có cỡ hạt 5  $\mu\text{m}$ ;

– cột bảo vệ pha đảo tương ứng thích hợp;

Cũng có thể sử dụng các cột có các kích thước khác.

**5.1.3 Detector huỳnh quang** có thể sử dụng bước sóng kích thích  $\lambda = 335 \text{ nm}$  và bước sóng phát xạ  $\lambda = 440 \text{ nm}$ .

**5.1.4 Hệ thống dữ liệu**

**5.2 Bộ trộn, bộ đồng hoá hoặc máy trộn.**

**5.3 Giấy lọc gấp nếp.**

**5.4 Cột chiết pha rắn trao đổi anion mạnh**, ví dụ: Các ống Bond-Elut<sup>1)</sup> SAX, chứa 500 mg chất hấp phụ, hoặc loại tương đương.

**5.5 Ống chiết SPE**

**5.6 Bộ cô dung môi**, có bộ phận gia nhiệt hoặc loại tương đương.

**5.7 Bộ lọc màng**, dùng để lọc các dung dịch, có cỡ lỗ  $0,45 \mu\text{m}$ .

## 6 Lấy mẫu

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

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiên mẫu cho đến khi lọt hết qua sàng cỡ lỗ  $1,0 \text{ mm}$  và đồng hoá mẫu.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Chiết tách

Cho  $50 \text{ g}$  mẫu thử vào vật chứa thủy tinh hoặc chất dẻo thích hợp (ví dụ: ống ly tâm bằng chất dẻo  $250 \text{ ml}$ ). Chiết trong  $3 \text{ min}$  với  $100 \text{ ml}$  dung dịch metanol (4.3), sử dụng bộ trộn (5.2) với tốc độ khoảng  $10\,000 \text{ min}^{-1}$ . Thời gian cần thiết để kết thúc quá trình chiết này có thể thay đổi tùy thuộc vào loại thiết bị được sử dụng.

<sup>1)</sup> Bond-Elut là một ví dụ về sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và EN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Cho ly tâm dịch chiết trong 10 min ở 500 g và lọc phần nổi phía trên qua giấy lọc gấp nếp (5.3). Kiểm tra pH của dịch rửa giải và chỉnh pH đến khoảng từ 5,8 đến 6,5, bằng dung dịch natri hydroxit (4.11), nếu cần.

## 8.2 Làm sạch

Gắn hộp SPE (5.4) vào ống chiết SPE (5.5) và ổn định bằng cách rửa liên tiếp với 5 ml metanol (4.2) sau đó với 5 ml dung dịch metanol (4.3). Giữ tốc độ dòng không quá 2 ml/min, lấy 10 ml dịch chiết mẫu đã lọc cho vào hộp SPE. Rửa hộp bằng 8 ml dung dịch nước-metanol (4.3), sau đó bằng 3 ml metanol (4.2). Không để hộp bị khô. Bỏ nước rửa. Rửa giải fumonisin bằng 10 ml axit axetic 1 % trong metanol (4.6) ở tốc độ không quá 1 ml/min. Thu dịch rửa giải vào lọ nhỏ thích hợp.

Chuyển dịch rửa giải vào lọ thu nhận thích hợp và cho bay hơi dịch rửa giải đến khô sử dụng bộ bay hơi dung môi (5.6) dưới dòng khí nitơ ở nhiệt độ khoảng 60 °C. Rửa lọ thu nhận bằng 1 ml metanol (4.2) và cho nước rửa vào lọ thích hợp. Làm bay hơi metanol đã bổ sung bằng dòng nitơ, đảm bảo rằng tất cả axit axetic đã bay hơi hết và đậy nắp lọ. Bảo quản cặn đã sấy còn lại ở khoảng 4 °C cho đến khi phân tích, lượng này cần được phân tích trong vòng hai tuần.

## 8.3 Tạo dẫn xuất và xác định

### 8.3.1 Dung dịch dẫn xuất chuẩn

Chuyển 25 µl dung dịch chuẩn fumonisin (4.14) vào đáy ống nghiệm nhỏ. Thêm 225 µl thuốc thử tạo dẫn xuất (4.13), trộn mạnh dung dịch và bơm một lượng (ví dụ 10 µl = 0,050 µg FB<sub>1</sub> và FB<sub>2</sub>) của dung dịch dẫn xuất vào cột HPLC (5.1.2) ở thời gian lặp lại trong vòng 3 min sau khi thêm thuốc thử tạo dẫn xuất. Nếu sử dụng hiệu chuẩn từng điểm riêng lẻ thì chỉnh độ nhạy của detector huỳnh quang (5.1.3) đến ít nhất 80 % độ đáp ứng của máy ghi.

### 8.3.2 Dung dịch thử của ngô

Hoà tan lại cặn đã sấy (xem 8.2) trong 200 µl metanol (4.2). Có thể sử dụng dung dịch axetonitril (4.4). Chuyển 25 µl dung dịch này sang đáy ống nghiệm nhỏ và thêm 225 µl thuốc thử tạo dẫn xuất (4.13). Trộn đều các dung dịch và bơm một lượng, ví dụ: 10 µl dung dịch dẫn xuất sang cột HPLC (5.1.2) ở thời gian lặp lại trong vòng 3 min sau khi thêm thuốc thử tạo dẫn xuất (4.13). Nếu các pic của fumonisin vượt quá các pic của dung dịch chuẩn fumonisin hoặc vượt quá điểm cao nhất của đường chuẩn (4.14) thì phải pha loãng tiếp dịch chiết mẫu thử bằng metanol (4.2) và lặp lại việc tạo dẫn xuất.

**CHÚ THÍCH 1** Điều có tính quyết định ở đây là thời gian lặp lại giữa lần thêm thuốc thử (4.13) và bơm lên cột HPLC, vì sự suy yếu nhanh về huỳnh quang của dẫn xuất fumonisin có thể xuất hiện sau giai đoạn đến 4 min.