

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6685:2009

ISO 14501:2007

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SỮA BỘT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN M₁
– LÀM SẠCH BẰNG SẮC KÝ ÁI LỰC MIỄN DỊCH VÀ XÁC
ĐỊNH BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M₁ content –
Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination
by high-performance liquid chromatography*

HÀ NỘI - 2009

Lời nói đầu

TCVN 6685:2009 thay thế TCVN 6685:2000;

TCVN 6685:2009 hoàn toàn tương đương với ISO 14501:2007;

TCVN 6685:2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất
lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sữa bột – Xác định hàm lượng aflatoxin M₁ – Làm sạch bằng sắc ký ái lực miễn dịch và xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M₁ content –
Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination
by high-performance liquid chromatography*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng aflatoxin M₁ trong sữa và sữa bột. Giới hạn phát hiện đối với sữa bột nguyên chất là 0,08 µg/kg, tức là 0,008 µg/l đối với sữa hoàn nguyên dạng lỏng.

Phương pháp này cũng có thể áp dụng cho sữa có hàm lượng chất béo thấp, sữa gầy, sữa bột có hàm lượng chất béo thấp và sữa bột gầy.

CẢNH BÁO

1 Phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này có sử dụng đến các dung dịch aflatoxin M₁. Aflatoxin là chất gây ung thư cho người. Cần chú ý tới thông báo của Tổ chức nghiên cứu ung thư Thế giới [4], [5].

2 Phòng thử nghiệm triển khai kỹ thuật này phải đảm bảo tránh ánh sáng mặt trời và các dung dịch chuẩn aflatoxin cũng phải được bảo vệ tránh ánh sáng, ví dụ như sử dụng giấy nhôm.

3 Các dụng cụ thủy tinh (ví dụ, ống nghiệm, lọ, bình, cốc có mỏ, ống bơm) chưa được rửa bằng axit dùng để đựng các dung dịch aflatoxin thì có thể làm thất thoát aflatoxin.

Ngoài ra, các dụng cụ thủy tinh mới của phòng thử nghiệm trước khi tiếp xúc với các dung dịch aflatoxin nên ngâm vài giờ trong axit loãng (ví dụ, axit sulfuric 2 mol/l), rồi tráng kỹ bằng nước cất để loại bỏ hết các vết axit (kiểm tra để bảo đảm là pH trong khoảng từ 6 đến 8).

4 Cần tiến hành khử nhiễm tất cả các chất thải phòng thử nghiệm như các hợp phần chất rắn, dung môi hữu cơ, các dung dịch lỏng, các chất rơi rớt trong khi tiến hành và các dụng cụ thủy tinh tiếp xúc với các chất gây ung thư. Các quy trình khử nhiễm này đã được xây dựng và đánh giá hiệu lực bởi Tổ chức nghiên cứu ung thư Thế giới ^{[4],[5]}.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

2.1

Hàm lượng aflatoxin M₁ (aflatoxin M₁ content)

Nồng độ hoặc phần khối lượng của các chất xác định được bằng quy trình qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Nồng độ aflatoxin M₁ được biểu thị bằng microgam trên lít hoặc phần khối lượng microgam trên kilogam.

3 Nguyên tắc

Cho phần mẫu thử đi qua cột sắc ký ái lực miễn dịch để chiết tách aflatoxin M₁, cột này có chứa các kháng thể đặc thù được liên kết với chất phụ trợ rắn.

Khi mẫu thử đi qua cột thì các kháng thể sẽ kết hợp một cách chọn lọc với bất kỳ aflatoxin M₁ nào (kháng nguyên) có mặt và tạo ra một phức kháng nguyên-kháng thể. Tất cả các thành phần khác của mẫu thử được rửa sạch khỏi cột bằng nước. Sau đó rửa giải aflatoxin M₁ khỏi cột và thu lấy dung môi rửa giải. Lượng aflatoxin M₁ có mặt trong dung môi rửa giải được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có phát hiện huỳnh quang.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại ion hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có qui định khác.

4.1 Cột sắc ký ái lực miễn dịch

Cột sắc ký ái lực miễn dịch phải chứa các kháng thể kháng aflatoxin M₁. Cột phải có khả năng hấp thụ tối đa không nhỏ hơn 100 ng aflatoxin M₁ (tương ứng với 2 µg/l khi sử dụng cho 50 ml phần mẫu thử). Cột phải có độ thu hồi không nhỏ hơn 80 % đối với aflatoxin M₁ khi sử dụng một dung dịch chuẩn chứa 4 ng độc tố (tương ứng với 80 ng/l khi dùng thể tích mẫu là 50 ml). Có thể sử dụng bất kỳ cột sắc ký ái lực miễn dịch nào khi đáp ứng được các yêu cầu trên. Hiệu quả của các cột phải được kiểm tra thường xuyên và ít nhất là một lần đối với mỗi loạt cột (xem 4.1.1 và 4.1.2).

4.1.1 Kiểm tra khả năng của cột

Pha loãng 1,0 ml dung dịch gốc chuẩn aflatoxin M₁ (4.4.2) đến 50 ml bằng nước. Trộn kỹ và cho toàn bộ thể tích này lên cột ái lực miễn dịch theo đúng chỉ dẫn của nhà sản xuất cột. Rửa cột, rửa giải độc tố. Xác định lượng aflatoxin M₁ được rửa giải từ cột bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sau khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thích hợp của dịch rửa giải cuối cùng.

Tính khả năng lưu giữ đối với aflatoxin. So sánh kết quả này với các yêu cầu trong 4.1.

4.1.2 Kiểm tra độ thu hồi

Dùng một pipet (5.4) để pha loãng 0,8 ml dung dịch làm việc chuẩn 0,005 µg/ml aflatoxin M₁ (4.4.3) đến 10 ml bằng nước. Trộn kỹ và cho toàn bộ thể tích này lên cột chọn lọc theo đúng chỉ dẫn của nhà sản xuất cột. Rửa cột, rửa giải độc tố. Xác định lượng aflatoxin M₁ được rửa giải từ cột bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sau khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thích hợp của dịch rửa giải cuối cùng.

Tính độ thu hồi đối với aflatoxin. So sánh kết quả này với các yêu cầu trong 4.1.

4.2 Axetonitril, tinh khiết, dùng cho HPLC.

4.2.1 Dung dịch axetonitril, 25 %

Cho 250 ml axetonitril (4.2) vào 750 ml nước và trộn. Có thể sử dụng các tỷ lệ khác. Đuổi khí trong dung dịch trước khi dùng.

4.2.2 Dung dịch axetonitril, 10 %

Cho 100 ml axetonitril (4.2) vào 900 ml nước và trộn. Có thể sử dụng các tỷ lệ khác. Đuổi khí trong dung dịch trước khi dùng.

4.3 Khí nitơ.

4.4 Dung dịch chuẩn aflatoxin M₁

4.4.1 Dung dịch hiệu chuẩn chuẩn aflatoxin M₁

Chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn chuẩn aflatoxin M₁ bằng cách hoà aflatoxin M₁ (C₁₇H₁₂O₇) trong axetonitril (4.2) để có được nồng độ chuẩn là 10 µg/ml. Xác định nồng độ aflatoxin M₁ chính xác bằng cách đo độ hấp thụ của nó ở bước sóng hấp thụ cực đại như sau.

Sử dụng máy đo quang phổ (5.14) ghi lại độ hấp thụ của dung dịch hiệu chuẩn chuẩn aflatoxin M₁ dựa trên axetonitril (4.2) dùng làm mẫu trắng ở bước sóng từ 330 nm đến 370 nm. Đo độ hấp thụ, A, ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại, λ_{max}, gần 350 nm.

TCVN 6685:2009

Tính nồng độ, c_1 , bằng microgam trên mililit, theo công thức (1):

$$c_1 = A \times M \times \frac{100}{d \times \epsilon}$$

trong đó

A là giá trị độ hấp thụ ở λ_{\max} ;

M là phân tử lượng của aflatoxin M_1 , tính bằng gam trên mol ($M = 328$ g/mol);

d là chiều dài đường quang, tính bằng centimet ($d = 1$ cm);

ϵ là hệ số hấp thụ của độc tố trong axetonitril, tính bằng mét vuông trên mol ($\epsilon = 1985$ m²/mol).

4.4.2 Dung dịch gốc chuẩn aflatoxin M_1

Sau khi kiểm tra nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn chuẩn (4.4.1), pha loãng dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin M_1 trong axetonitril (4.2) để có được dung dịch gốc chuẩn aflatoxin M_1 bằng 0,1 µg/ml. Dung dịch gốc chuẩn này phải được đậy kín và bọc trong giấy nhôm để tránh ánh sáng.

Bảo quản dung dịch này trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 1 °C đến 5 °C ở nơi tối. Trong các điều kiện này, dung dịch gốc có thể ổn định ít nhất hai tháng. Nếu dung dịch gốc chuẩn này sử dụng sau hai tháng, thì phải kiểm tra lại nồng độ aflatoxin M_1 trước khi sử dụng. Nếu đã bị thay đổi thì bỏ và chuẩn bị dung dịch gốc chuẩn mới.

4.4.3 Dung dịch làm việc chuẩn aflatoxin M_1

Trước khi chuẩn bị các dung dịch làm việc chuẩn aflatoxin M_1 , để dung dịch gốc chuẩn (4.4.2) ở nhiệt độ môi trường. Chuẩn bị các dung dịch làm việc chuẩn trong ngày sử dụng.

Pha loãng dung dịch gốc chuẩn aflatoxin M_1 (4.4.2) với dung dịch axetonitril 10 % (4.2.2) đến khi thu được nồng độ aflatoxin M_1 là 0,005 µg/ml.

Dùng dung dịch đã pha loãng này để chuẩn bị một loạt các dung dịch pha loãng aflatoxin M_1 chuẩn thích hợp, tùy thuộc vào thể tích vòng bơm để có được 0,05 ng/ml, 0,10 ng/ml, 0,20 ng/ml và 0,40 ng/ml aflatoxin M_1 bằng cách pha loãng với dung dịch axetonitril 10 % (4.2.2). Có thể chọn các độ pha loãng khác, tùy thuộc vào thể tích vòng tiêm.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

- 5.1 **Xyranh sử dụng một lần**, dung tích 10 ml và 50 ml.
- 5.2 **Hệ thống tạo chân không**, (ví dụ, bình Buchner, hệ thống Vac-Elut¹⁾ hoặc bơm nhu động).
- 5.3 **Máy ly tâm**, có thể tạo gia tốc quay tối thiểu 2000 g.
- 5.4 **Pipet**, dung tích 1,0 ml, 2,0 ml và 50,0 ml hoặc **pipet tự động** thích hợp.
- 5.5 **Cốc thủy tinh có mỏ**, dung tích 250 ml.
- 5.6 **Bình định mức một vạch**, dung tích 100 ml.
- 5.7 **Nồi cách thủy**, có khả năng duy trì ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, từ $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ và $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.8 **Giấy lọc**, Whatman số 4¹⁾, hoặc tương đương.
- 5.9 **Ống thủy tinh hình nón được chia độ**, có cổ mài và nút đậy, dung tích 5 ml, 10 ml và 20 ml.
- 5.10 **Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**, được gắn với bơm không xung, thích hợp đối với tốc độ dòng ổn định khoảng 1 ml/min và có hệ thống bơm mẫu, có vòng thể tích bơm cố định hoặc có thể thay đổi, để bơm được từ 20 μl đến 500 μl .
- 5.11 **Cột phân tích HPLC pha đảo**, được nhồi bằng octadexyl silicagel có kích thước hạt là 3 μm hoặc 5 μm , với cột bảo vệ được nhồi đầy bằng vật liệu pha đảo.
- 5.12 **Detector huỳnh quang**, có bước sóng kích thích 365 nm và bước sóng phát xạ 435 nm và cho phép phát hiện (tỷ lệ của tín hiệu và tiếng ồn: 5) aflatoxin M₁ khi bơm 0,02 ng trong các điều kiện sắc ký thích hợp.
- 5.13 **Thiết bị ghi đồ thị dài**, kèm một máy in hoặc máy vẽ đồ thị, hoặc **thiết bị tích phân điện tử** hoặc **hệ thống xử lý số liệu bằng máy tính**.
- 5.14 **Máy đo quang phổ**, có thể đo ở các bước sóng từ 200 nm đến 400 nm, có các cuvet thạch anh có chiều dài quang học 1 cm.
- 5.15 **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

6 Lấy mẫu

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

¹⁾ Hệ thống Vac-Elut và Whatman là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng còn ISO không ấn định phải sử dụng chúng

TCVN 6685:2009

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

7 Cách tiến hành

Thực hiện qui trình này càng tránh xa ánh sáng càng tốt.

Chú ý rằng các phương pháp hoàn nguyên bột sữa, ly tâm, nạp mẫu lên cột sắc ký ái lực miễn dịch, rửa cột và rửa giải cột có sự khác nhau giữa các nhà sản xuất cột. Các hướng dẫn sử dụng cột cụ thể phải được thực hiện một cách chính xác.

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

7.1.1 Sữa

Làm ấm mẫu sữa đến nhiệt độ từ 35 °C đến 37 °C trên nồi cách thủy (5.7). Lọc sữa qua giấy lọc (5.8), sử dụng vải bộ lọc, nếu cần, hoặc ly tâm với gia tốc 2000 g trong 15 min. Thu lấy ít nhất 50 ml sữa đã được xử lý. Tiếp tục theo qui trình trong 7.3.

7.1.2 Sữa bột

Cân 10 g mẫu, chính xác đến 0,01 g cho vào cốc có mỏ dung tích 250 ml (5.5). Lấy 50 ml nước đã được làm ấm đến 50 °C trên nồi cách thủy (5.7) và thêm từ từ vào sữa bột. Dùng que để khuấy cho đến khi thu được hỗn hợp đồng nhất.

Nếu các mẫu thử chưa hoà tan được hết, thì đặt cốc trên nồi cách thủy (5.7) ở 50 °C ít nhất 30 min. Trộn kỹ.

Để dung dịch nguội đến nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C. Dùng một ít nước để chuyển hết sang bình định mức một vạch dung tích 100 ml (5.6). Pha loãng bằng nước đến vạch 100 ml. Lọc sữa đã hoàn nguyên qua giấy lọc (5.8) hoặc ly tâm với gia tốc 2000 g trong 15 min. Thu lấy ít nhất 50 ml sữa đã chuẩn bị. Tiếp tục theo qui trình trong 7.3.

7.2 Chuẩn bị cột sắc ký ái lực miễn dịch

Gắn xyranh dùng một lần 50 ml (5.1) lên đỉnh cột sắc ký ái lực miễn dịch (4.1). Nối đầu dưới cột với hệ thống hút chân không (5.2).

7.3 Chiết và tinh sạch mẫu thử

Dùng pipet lấy 50 ml mẫu thử đã chuẩn bị (7.2.1 hoặc 7.2.2) cho vào xyranh 50 ml (5.1). Cho đi qua cột sắc ký ái lực miễn dịch với tốc độ chậm ổn định từ 2 ml/min đến 3 ml/min, dùng hệ thống hút chân không (5.2) để kiểm soát tốc độ dòng chảy.

Tháo xyranh 50 ml ra và thay bằng xyranh 10 ml sạch. Rửa cột bằng 10 ml nước bằng cách cho nước đi qua cột với một tốc độ dòng chảy ổn định. Sau khi làm sạch, thổi cột đến khô hoàn toàn.

Tháo cột ra khỏi hệ thống hút chân không. Rửa giải aflatoxin M₁ từ từ khỏi cột bằng cách dùng xyranh 10 ml lấy 4 ml axetonitril tinh khiết (4.2) cho đi qua cột trong khoảng 60 s. Dùng pittong của xyranh để kiểm soát tốc độ dòng.

Thu lấy dịch rửa giải vào một ống hình nón (5.9). Giảm thể tích dung môi rửa giải đến thể tích, V_e, khoảng từ 20 µl đến 500 µl bằng cách đặt ống trên nổi cách thủy (5.7) để ở 30 °C và thổi nhẹ một luồng khí nitơ (4.3) trên ống.

CẢNH BÁO Nếu cho bay hơi đến khô hoàn toàn thì có thể làm thất thoát aflatoxin M₁.

Dùng nước tạo một thể tích dung môi rửa giải cuối cùng, V_f = 10V_e, tức là từ 500 µl đến 5000 µl (xem Chú thích).

CHÚ THÍCH Nếu hàm lượng axetonitril của chất chiết đã bơm chứa aflatoxin M₁, vượt quá giới hạn 10 % (phần thể tích), thì trong sắc đồ HPLC sẽ xuất hiện việc giãn rộng pic. Tuy nhiên, hàm lượng nước trên 90 % (phần thể tích) thì sẽ không ảnh hưởng lên hình dạng pic⁽⁸⁾.

7.4 Sắc ký lỏng hiệu năng cao

7.4.1 Chuẩn bị bơm

Bơm dung môi rửa giải (4.2.1) với tốc độ dòng ổn định qua cột HPLC. Tùy thuộc loại cột được sử dụng, mà có thể điều chỉnh tỷ lệ axetonitril/nước của dịch rửa giải HPLC (4.2.1), nếu cần, để chắc chắn tách hết aflatoxin M₁ khỏi các thành phần khác.

CHÚ THÍCH Tốc độ dòng của dịch rửa giải (4.2.1) phụ thuộc vào cột (5.11) được sử dụng. Theo hướng dẫn về cột thông thường có chiều dài khoảng 25 cm và đường kính trong khoảng 4,6 mm, thì tốc độ dòng tối ưu khoảng 1 ml/min; có đường kính trong khoảng 3 mm, thì tốc độ dòng tối ưu là khoảng 0,5 ml/min.

Để đạt các điều kiện tối ưu nhất định, nên sử dụng một dịch chiết mẫu (tốt nhất là không chứa aflatoxin M₁) bơm riêng rẽ và bơm kết hợp với dung dịch làm việc chuẩn aflatoxin M₁ (4.4.3).

7.4.2 Chạy sắc ký

Kiểm tra độ ổn định của hệ thống sắc ký bằng cách bơm lặp lại một lượng cố định dung dịch chuẩn làm việc aflatoxin M₁ (4.4.3) cho đến khi đạt được diện tích phần pic hoặc chiều cao pic không đổi. Các lần bơm liên tiếp không được sai khác quá 5 % tính theo diện tích phần pic hoặc chiều cao pic.

Thời gian lưu các pic aflatoxin M₁ phụ thuộc vào nhiệt độ. Do đó phải hiệu chỉnh độ chệch trong hệ thống detector, bằng cách bơm một lượng cố định dung dịch làm việc chuẩn aflatoxin M₁ (4.4.3) theo

từng khoảng thời gian đều đặn. Nếu cần, kết quả của dung dịch chuẩn làm việc có thể được hiệu chỉnh về độ chệch.

7.4.3 Dung dịch chuẩn aflatoxin M₁

Bơm lần lượt các dung dịch làm việc chuẩn aflatoxin M₁ (4.4.3) tùy thuộc thể tích của vòng bơm, lấy các thể tích thích hợp có chứa tương ứng 0,05 ng, 0,10 ng, 0,20 ng và 0,40 ng aflatoxin M₁ cho vào HPLC. Dụng đồ thị chuẩn theo diện tích phần pic hoặc chiều cao pic cho mỗi dung dịch làm việc gốc tương ứng với khối lượng aflatoxin M₁ được bơm.

7.4.4 Phân tích các dịch chiết đã tinh sạch và sơ đồ bơm

Bơm một thể tích tương tự của dịch rửa giải (7.3) như đã dùng cho các dung dịch làm việc chuẩn (7.4.3) vào HPLC qua vòng bơm. Tách tất cả aflatoxin M₁ có mặt, sử dụng các điều kiện như đối với các dung dịch chuẩn. Tiến hành bơm các dung dịch chuẩn và các dịch chiết mẫu theo một sơ đồ bơm xác định.

Khi cần bơm một dãy liên tiếp các dung môi rửa giải mẫu, thì cứ sau năm lần bơm dịch rửa giải mẫu, nên bơm xen kẽ một dung dịch làm việc chuẩn aflatoxin M₁.

Xác định diện tích hoặc chiều cao pic của aflatoxin M₁ của dịch rửa giải mẫu. Dựa vào đồ thị chuẩn, xác định khối lượng aflatoxin M₁ bằng nanogram có trong thể tích dịch chiết mẫu được bơm.

Nếu diện tích phần pic hoặc chiều cao pic của aflatoxin M₁ trong dung môi rửa giải mẫu lớn hơn diện tích phần pic hoặc chiều cao pic của dung dịch chuẩn cao nhất, thì pha loãng định lượng dung môi rửa giải bằng nước. Bơm lại dịch chiết đã pha loãng này vào HPLC như mô tả ở trên.

8 Tính toán và biểu thị kết quả

8.1 Sửa

8.1.1 Tính toán

Tính hàm lượng aflatoxin M₁ của mẫu thử, c, bằng microgam trên lít, theo công thức (2):

$$c = m_a \times \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \times \left(\frac{1}{V_s} \right) \quad (2)$$

trong đó:

m_a là khối lượng aflatoxin M₁ tương ứng với diện tích hoặc chiều cao pic của dịch rửa giải mẫu, tính bằng nanogram;

V_1 là thể tích của dung môi rửa giải mẫu được bơm, tính bằng microlit;

V_2 là thể tích cuối cùng của dịch rửa giải mẫu, tính bằng microlit;

V_3 là thể tích của mẫu thử đã chuẩn bị, đi qua cột, tính bằng mililit.

8.1.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả thử đến ba chữ số sau dấu phẩy.

8.2 Bột sữa

8.2.1 Tính toán

Tính hàm lượng aflatoxin M₁ của mẫu thử, theo khối lượng phần mẫu thử, w, bằng microgam trên kilogam, theo công thức (3):

$$w = m_u \times \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \times \left(\frac{1}{m_i} \right) \times f$$

trong đó:

m_i là khối lượng của mẫu thử có mặt trong 50 ml mẫu thử đã chuẩn bị (7.3), tính bằng gam;

f là hệ số pha loãng của mẫu thử (các dung dịch không pha loãng thì $f = 1$).

8.2.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả thử đến ba chữ số sau dấu phẩy.

9 Độ chụm

9.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này được tiến hành theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2).

Các giá trị nhận được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong cùng phòng thử nghiệm, do cùng một người thao tác trong

TCVN 6685:2009

cùng một khoảng thời gian ngắn như nhau, không quá 5 % trường hợp lớn hơn các giá trị nêu trong Phụ lục A.

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người thao tác khác nhau thực hiện và sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn các giá trị nêu trong Phụ lục A.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, và nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(quy định)

Các kết quả thử nghiệm liên phòng thử nghiệm

Một thử nghiệm liên phòng thử nghiệm gồm 16 phòng thí nghiệm tham gia, tiến hành trên các mẫu sữa bột có hàm lượng chất béo 1 % phần khối lượng (các mẫu thử "chất béo thấp" 1 và 3) và có hàm lượng chất béo 28 % phần khối lượng (các mẫu thử "chất béo cao" 2, 4 và 5). Các mẫu sữa bột có hàm lượng chất béo cao được giữ lại để chuẩn bị làm mẫu chuẩn^[6], vì đã biết hàm lượng aflatoxin M₁.

Đối với sữa bột bị nhiễm bẩn thì các mức aflatoxin M₁ dao động từ 0,08 µg/kg đến 0,6 µg/kg, tức là từ 0,008 µg/l đến 0,060 µg/l đối với sữa hoàn nguyên.

Các kết quả thu được đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[2] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[3] cho các số liệu về độ chụm như trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Các số liệu về độ chụm

Mẫu	1	2	3	4	5
Số phòng thử nghiệm tham gia*	12	14	13	11	14
Giá trị trung bình, \bar{w} (µg/kg)	0,081	0,150	0,080	0,202	0,580
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r (µg/kg)	0,008	0,022	0,005	0,010	0,073
Giới hạn độ lặp lại, $r = 2,8 s_r$ (µg/kg)	0,023	0,060	0,015	0,027	0,203
Hệ số biến thiên lặp lại, $CV(r)$ (%)	9,9	14,0	6,8	4,7	12,5
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R (µg/kg)	0,019	0,035	0,015	0,022	0,110
Giới hạn độ tái lập, $R = 2,8 s_R$ (µg/kg)	0,052	0,098	0,041	0,061	0,310
Hệ số biến thiên tái lập, $CV(R)$ (%)	23	22,7	18,3	10,8	19,1
* Các phòng thử nghiệm đã loại ra sử dụng phép thử ngoại lệ Cochran và/hoặc Grubbs.					

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
- [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
- [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), 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.
- [4] Khử nhiễm phòng thí nghiệm và phá huỷ aflatoxin B₁, B₂ và G₂ trong nước thải phòng thí nghiệm Castegnaro M., Hunt D.C., Sansone E.B., Schuller P.L., Siriwardana M.G., Telling G.M., Van Egmond. và Walker E.A. IARC Xuất bản khoa học số 37. Tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới (WHO), Lyon (Pháp), 1980, 59 trang.
- [5] Khử nhiễm phòng thí nghiệm và phá huỷ các chất gây ung thư trong nước thải phòng thí nghiệm: một loại số độc tố. Castegnaro M., Barek J., Fremy J.M., Lafontaine M., miraglia M., Sansone E.B. và Telling G.M., IARC Xuất bản khoa học số 113. Tổ chức nghiên cứu ung thư thế giới (WHO), Lyon (Pháp), 1991, 63 trang.
- [6] Ủy ban Cộng đồng Châu Âu. Chứng nhận aflatoxin M₁ trong ba mẫu sữa bột, CRM số 282, 284, 285, van. Egmond H.P và Wagstaffe P.J., Báo cáo và phụ lục, EUR 10412, 1986.
- [7] IDF nghiên cứu liên phòng thí nghiệm về việc xác định aflatoxin M₁ trong sữa bột, sử dụng cột chọn lọc. L.G.M.T. Tuinstra, Roos A.H., và van. Trijp J.M.P., Báo cáo của RIKILT, 92, 1992, trang 14.
- [8] Xác định sắc ký lỏng về aflatoxin M₁ trong sữa bột sử dụng cột chọn lọc để làm sạch: Nghiên cứu liên phòng thí nghiệm. L.G.M.T. Tuinstra, Roos A.h., và van. Trijp J.M.P., J. A. O. A. C. 1993, 76 (6), trang 1248 – 1254.
-