Thực phẩm – Xác định aflatoxin B_1 và tổng aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2 trong ngũ cốc, quả có vỏ và sản phẩm của chúng – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao có dẫn suất sau cột và làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch

Foodstuffs – Determination of aflatoxin B_1, and the sum of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in cereals, shell-fruits and derived products – High performance liquid chromatographic method with post column derivatization and immunoaffinity column clean up

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng aflatoxin lớn hơn 8 µg/kg.

Phương pháp này đã được thẩm định trong một nghiên cứu liên phòng thí nghiệm theo ISO 5725:1986 trên ngô chứa 24,5 µg/kg, bơ lạc chứa 8,4 µg/kg và lạc chứa 16 µg/kg tổng aflatoxin.

Một số thử nghiệm sau khi được thẩm định nội bộ đã cho thấy rằng phương pháp này có thể được sử dụng cho một số loại ngũ cốc, sản phẩm hạt có dầu, quả có vỏ, quả sấy khô và các sản phẩm của chúng.

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.

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

Mẫu thử nghiệm được chiết tách với hỗn hợp metanol và nước. Dịch chiết được lọc, pha loãng với nước, và sử dụng cột ái lực chứa kháng thể đặc hiệu đối với aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2. Các aflatoxin được phân tách, tinh chế và cô đặc trên cột sau khi được tách khỏi kháng thể với metanol. Hàm lượng aflatoxin được xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo và phát hiện bằng huỳnh quang và dẫn xuất sau cột iod.

CẢNH BÁO Phương pháp này mô tả các yêu cầu đối với việc sử dụng các dung dịch aflatoxin. Aflatoxin là tác nhân gây ung thư đối với người. Trích từ văn bản của Tổ chức Nghiên cứu Ung thư quốc tế (International Agency for Research on Cancer - WHO) [1], [2].

4 Thuốc thử

4.1 Yêu cầu chung

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải thuộc loại phân tích và nước được sử dụng phải là nước loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có qui định khác.

4.2 Natri clorua.

4.3 Iot, tinh thể.

4.4 Aflatoxin, dạng tinh thể hoặc được đóng thành con nhộng.

CẢNH BÁO Tiến hành phân tích tránh ánh sáng mặt trời. Có thể thực hiện hiệu quả bằng cách dùng tấm hấp thụ tia tử ngoại che trên cửa sổ và sử dụng ánh sáng mờ (không phải ánh sáng trực tiếp mặt trời) hoặc màn che hoặc rèm sử dụng ánh sáng nhân tạo (đèn huỳnh quang có thể chấp nhận được).

Bảo vệ các dung dịch có chứa aflatoxin càng tránh ánh sáng càng tốt (giữ nơi tối, dùng màng nhôm hoặc chai thủy tinh màu hổ phách).

4.5 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

4.6 Metanol, loại dùng cho phân tích.

4.7 Metanol, loại dùng cho HPLC.

4.8 Toluen.

4.9 Dung môi chiết

Trộn 7 phần thể tích metanol (4.6) với 3 phần thể tích nước.

4.10 Cột miễn nhiễm

Cột miễn nhiễm (IA) chứa các kháng thể kháng aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2. Cột IA phải có khả năng liên kết tối thiểu không ít hơn 100 ng aflatoxin B_1 và phải khôi phục được không ít hơn 80 % aflatoxin B_1, B_2, G_1 và không ít hơn 60 % aflatoxin G_2 khi dung dịch chuẩn gồm 15 ml hỗn hợp metanol/nước (1 phần thể tích metanol và 3,4 phần thể tích nước) chứa 5 ng mỗi loại độc tố được sử dụng trên cột IA. Cột IA phải cung cấp bộ phận chứa dung môi thích hợp, ví dụ như xyranh cùng với bộ chỉnh lưu.

4.11 Pha động

Thành phần pha động gồm nước:axetonitril (4.5):metanol (4.7) với tỷ lệ 3:1:1. Khử khí dung dịch trước khi sử dụng.

4.12 Hóa chất dẫn xuất sau cột

Hòa tan 100 mg iot (4.3) trong 2 ml metanol (4.6). Thêm 200 ml nước, khuấy trong 1 h và lọc qua màng lọc 0,45 µm (5.8). Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong tuần và bảo quản dung dịch trong bóng tối hoặc trong chai thủy tinh sẫm màu. Khuấy dung dịch trong 10 min trước khi sử dụng.

4.13 Hỗn hợp toluen/axetonitril

Trộn 98 phần thể tích toluen (4.8) với 2 phần thể tích axetonitril (4.5).

4.14 Các dung dịch gốc aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2

Hòa tan riêng biệt aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2 trong hỗn hợp toluen/axetonitril (4.13) để thu được các dung dịch chứa 10 µg/ml.

Để xác định nồng độ chính xác của aflatoxin trong mỗi dung dịch gốc, quét đường hấp thụ giữa bước sóng 330 nm và 370 nm trong cuvet thạch anh (5.7) trong máy đo phổ với hỗn hợp toluen/axetonitril (4.13) trên đường chuẩn. Tính nồng độ của mỗi loại aflatoxin, ρ_i, bằng µg/ml, theo công thức (1):

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

trong đó:

A_{max} độ hấp thụ cực đại xác định được trên đường hấp thụ;

M_i khối lượng phân tử tương đối của mỗi aflatoxin, tính bằng gam trên mol;

ε_i độ hấp thụ phân tử của mỗi aflatoxin với toluen/axetonitril (4.13), tính bằng mét vuông trên mol;

d là bề dày của cuvet, tính bằng centimet.

M_i và ε_i được cho trong Bảng 1.

Bảng 1 – Khối lượng phân tử tương đối và độ hấp thụ phân tử của aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2

(Hỗn hợp của toluen và axetonitril 98 + 2)

Aflatoxin	M_r g/mol	ε m^2/mol
B_1	312	1 930
B_2	314	2 040
G_1	328	1 660
G_2	330	1 790

4.15 Dung dịch hỗn hợp gốc aflatoxin

Chuẩn bị một dung dịch gốc chứa 500 ng/ml aflatoxin B_1, 125 ng/ml aflatoxin B_2, 250 ng/ml aflatoxin G_1 và 125 ng/ml aflatoxin G_2 trong hỗn hợp toluen/axetonitril (4.13). Trong khi bảo quản dung dịch, cân bình chứa và ghi lại bất kỳ sự thay đổi nào về khối lượng khi sử dụng dung dịch. Bọc kín bình trong giấy nhôm và bảo quản ở nhiệt độ khoảng 4 °C.

LƯU Ý Nếu để lộ sáng, ánh sáng cực tím sẽ ảnh hưởng đến kết quả do sự hấp thụ do sự biến đổi sinh ra photon không quan sát được.

4.16 Các dung dịch chuẩn hỗn hợp aflatoxin

Chuyển mỗi lượng dung dịch hỗn hợp gốc aflatoxin (4.15) theo quy định trong Bảng 2 vào một dãy 4 bình định mức 2 ml (5.5). Cho dung dịch bay hơi đến khô bằng dòng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Thêm 1 ml metanol vào mỗi bình, lắc đều, thêm nước đến vạch và lắc tiếp. Dung dịch này được chuẩn bị để sử dụng trong ngày.

Bảng 2 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn

Dung dịch chuẩn	Lấy từ dung dịch gốc (µl)	Nồng độ khối lượng, ng/ml			
		B_1	B_2	G_1	G_2
1	60	15,0	3,75	7,50	3,75
2	40	10,0	2,50	5,00	2,50
3	20	5,00	1,25	2,50	1,25
4	10	2,50	0,625	1,25	0,625
CHÚ THÍCH Các giá trị thu được dùng cho mục đích hướng dẫn. Khoảng chuẩn bao gồm nồng độ của các mẫu.					

4.17 Axit sulfuric, $c(H_2SO_4)$ = 2 mol/l.

5 Thiết bị và dụng cụ

5.1 Dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường

Ngâm các dụng cụ thủy tinh trong phòng thử nghiệm đã tiếp xúc với dung dịch aflatoxin trong axit sulphuric (4.16) trong vài giờ, sau đó rửa kỹ bằng nước (ví dụ 3 lần) để loại bỏ hết vết axit. Kiểm tra độ axit bằng giấy pH.

LƯU Ý Bước xử lí này là cần thiết, vì sử dụng các dụng cụ thủy tinh chưa rửa sạch axit có thể làm thất thoát aflatoxin. Trong thực tế, bước xử lí này cần thiết đối với bình cầu đáy tròn, bình định mức, ống đong, lọ hoặc ống dùng cho dung dịch hiệu chuẩn và dịch chiết (đặc biệt là các lọ lấy mẫu tự động) và pipet Pasteur, nếu chúng được dùng để chuyển các dung dịch hiệu chuẩn hoặc chất chiết.

Sử dụng thiết bị và dụng cụ của phòng thí nghiệm, cụ thể như sau:

5.2 Bộ trộn, dung tích 500 ml và nắp đậy.

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

5.4 Giấy lọc vi sợi thủy tinh, ví dụ đường kính 11 cm.

5.5 Bình định mức, ví dụ 2 ml.

5.6 Quang máy đo phổ, có khả năng đo ở bước sóng từ 200 nm đến 400 nm.

5.7 Cuvet thạch anh, dày 1 cm và hấp thụ không đáng kể ở bước sóng từ 300 nm tới 370 nm.

5.8 Màng lọc dùng cho dung dịch, bằng polytetrafloetylen (PTFE), đường kính 4 mm và kích thước lỗ 0,45 µm.

5.9 Thiết bị HPLC, bao gồm:

5.9.1 Bơm HPLC, phù hợp với tốc độ 1 ml/min.

5.9.2 Van bơm mẫu, gồm có xyranh 50 µl hoặc tương đương.

5.9.3 Cột pha đảo, ví dụ cột C_{18}, đảm bảo được tách đến đường nền các pic aflatoxin B_1, B_2, G_1 và G_2 khỏi các pic khác.

- dài 250 mm;
- đường kính trong 4,6 mm;
- cỡ hạt 5 µm.

Có thể sử dụng cột ngắn hơn.

5.9.4 Hệ thống dẫn xuất sau cột, gồm một bơm xung tự do thứ cấp và ống chữ T với ống polytetrafloetylen (PTFE) hoặc thép không rỉ dài từ 3 000 mm đến 5 000 mm và đường kính trong 0,5 mm và bể gia nhiệt hoặc bình phản ứng sau cột cho phản ứng iot.

5.10 Detector huỳnh quang, được kích thích ở bước sóng 365 nm và phát xạ ở bước sóng 435 nm (đối với thiết bị lọc: phát xạ ở bước sóng > 400 nm). Phải phát hiện được ít nhất 0,05 ng aflatoxin B_1 trong mỗi thể tích bơm (ở đây là 50 µl).

6 Cách tiến hành

6.1 Chiết tách

Cân 25 g mẫu thử đồng nhất, chính xác đến 10 mg, thêm 5 g natri clorua (4.2) và 125 ml dung môi chiết (4.9) rồi đồng hoá bằng máy trộn trong 2 min ở tốc độ cao.

LƯU Ý: Cần kiểm tra thời gian và tốc độ khuấy, tránh gây ảnh hưởng xấu tới hiệu suất chiết tách.

Lọc qua giấy lọc gấp nếp (5.3). Dùng pipet lấy 15 ml (V_2) dịch lọc (tổng thể tích dịch lọc V_1), cho vào bình nón thích hợp và có nút thủy tinh. Thêm 30 ml nước, đậy nut va lắc đều. Trước khi tiến hành sắc kí cột ái lực, lọc dịch chiết đã pha loãng qua giấy vi sợi thủy tinh (5.4). Dịch lọc (V_3) phải trong suốt. Tiến hành ngay theo 6.2.

6.2 Làm sạch

Chuẩn bị cột IA và tiến hành làm sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dùng pipet lấy 15 ml (V_4) dịch lọc lần 2 (tổng thể tích dịch lọc lần 2 là V_3), cho vào bình chứa dung môi của cột IA. Hứng nước giải hấp metanol hoặc axetonitril (tùy theo sản phẩm hoặc hướng dẫn của nhà sản xuất) vào bình định mức 2 ml (5.5) (hoặc bình định mức có thể tích khác theo quy định của nhà sản xuất). Pha loãng với nước và định mức tới vạch (V_5). Lắc đều và tiếp tục thực hiện theo 6.3.

Các dung dịch mẫu và các dung dịch chuẩn dùng trong xác định HPLC phải chứa cùng một loại dung môi hoặc hỗn hợp dung môi.

CHÚ Ý: Nếu các phương pháp chuyển lên cột IA, rửa và rửa giải có sự khác biệt giữa nhà sản xuất cột và các hướng dẫn cụ thể kèm theo cột, thì cần làm rõ. Nói chung, các qui trình gồm chiết tách mẫu với hỗn hợp metanol và nước, lọc hoặc li tâm, pha loãng mẫu với dung dịch đệm phosphat (PBS) hoặc nước khi có thể, nạp dưới áp lực lên cột đã rửa sơ bộ, rửa cột bằng nước cất và rửa giải aflatoxin với metanol hoặc axetonitril (tùy theo sản phẩm hoặc hướng dẫn của nhà sản xuất).

Cẩn thận tránh vượt quá dung tích tối đa của cột.

6.3 Điều kiện vận hành HPLC

Nối đầu ra của cột phân tách với một nhánh của ống chữ T (5.8.4), dùng một mẩu ngắn có đường kính trong, ví dụ 0,25 mm. Nối đầu ra của bơm thứ cấp với thuốc thử dẫn xuất sau cột với nhánh thứ 2 của ống chữ T. Nối đầu cuối của vòng PTFE hoặc thép không rỉ (5.8.4) với nhánh thứ 3 của ống chữ T và nối đầu còn lại với bộ dò. Dùng tủ hoặc nồi cách thuỷ để duy trì nhiệt độ của cuộn phản ứng ở 70 °C.

Khi sử dụng cột theo quy định tại 5.9.3, các phần cài đặt sau đây cho thấy thích hợp:

- tốc độ dòng của pha động (cột): 1,0 ml/min;
- tốc độ dòng của thuốc thử sau cột: 0,3 ml/min;
- thể tích bơm: 50 µl.

Cho toàn bộ hệ thống chạy từ 10 min đến 20 min để ổn định. Nếu sử dụng máy tích phân thì điều chỉnh bộ điều khiển độ nhạy của detector huỳnh quang hoặc của bộ tích phân để thu được tín hiệu: nhiễu = 5:1 đối với 0,125 ng aflatoxin G_2 trong 50 µl. Nếu sử dụng máy ghi thì điều chỉnh bộ điều khiển detector huỳnh quang để thu được biên độ từ 30 % đến 40 % với 0,125 ng aflatoxin G_2 trong 50 µl. Cho dịch lọc lần 2 (V_3) qua cột tách chiết, rửa cột theo mô tả trong hướng dẫn của nhà sản xuất và loại hết dung dịch rửa giải.

6.4 Nhận biết

Nhận biết mỗi pic aflatoxin trong sắc kí đồ của mẫu bằng cách so sánh thời gian lưu của các chất chuẩn tương ứng với chúng.

Cũng có thể nhận biết aflatoxin bằng cách bơm chất nhũ hóa dung dịch mẫu thử và các dung dịch chuẩn. Các pic aflatoxin B_1 và G_1 có thể biến mất nếu không bổ sung thuốc thử dẫn xuất để giúp cho việc nhận biết.

6.5 Đường chuẩn

Dựng đường chuẩn cho mỗi aflatoxin bằng cách bơm 50 µl các dung dịch chuẩn 1, 2, 3 và 4 (xem Bảng 2). Kiểm tra độ tuyến tính của đồ thị [4].

6.6 Xác định

Định lượng bằng phương pháp ngoại chuẩn, tính diện tích pic hoặc chiều cao pic. Chiều cao pic liên quan đến giá trị tương ứng của chất chuẩn.

Bơm một thể tích 50 µl hỗn hợp chuẩn lên vòng bơm theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Rửa giải aflatoxin theo thứ tự G_2, G_1, B_2, B_1 với thời gian lưu tương ứng khoảng 6 min, 8 min, 9 min và 11 min,

và phải có đường phân giải. Điều chỉnh thời gian lưu bằng cách thay đổi nồng độ metanol của dung môi pha động (4.10), nếu cần.

Bơm 50 µl (V_6) dịch chiết mẫu đã làm sạch (6.2) vào vòng bơm.

7 Biểu thị kết quả

Tính toán khối lượng mẫu thử m_t theo gam, có trong dịch lọc lần 2 thu được từ cột IA (V_4) theo công thức (2):

$$m_t = m_o \times \frac{V_2 \times V_4}{V_1 \times V_3} \qquad (2)$$

trong đó:

m_o khối lượng của phần thử (6.1), tính bằng gam (m_o = 25 g);

V_1 tổng thể tích của dịch lọc ban đầu (6.1), tính bằng mililit (V_1 = 125 ml);

V_2 thể tích dịch lọc được lấy lần đầu (6.1), tính bằng mililit (V_2 = 15 ml);

V_3 tổng thể tích của dịch lọc lần 2 (6.1), tính bằng mililit (V_3 = 45 ml);

V_4 thể tích dịch lọc được lấy lần 2 (6.2), tính bằng mililit (V_1 = 15 ml).

Tính phần khối lượng của mỗi aflatoxin, w_i, theo microgam trên kilogam mẫu theo công thức (3) (phương pháp ngoại chuẩn):

$$w_i = \frac{V_5 \times m_i}{V_6 \times m_t} \qquad (3)$$

trong đó:

V_5 thể tích của dung dịch giải hấp (6.2), tính bằng microlit (V_5 = 2 000 µl);

V_6 thể tích bơm của dung dịch giải hấp (6.6), tính bằng microlit (V_6 = 50 µl);

m_i khối lượng của mỗi aflatoxin *i* tương ứng với diện tích pic hoặc chiều cao pic đọc được từ đường chuẩn có trong thể tích bơm, tính bằng nanogam;

m_t khối lượng của mẫu thử, có trong phần dịch lọc thứ 2 thu được từ cột IA (V_4) (theo công thức (2)), tính bằng gam.

Thêm các phần khối lượng của 4 aflatoxin để thu được khối lượng của tổng aflatoxin.

8 Độ chụm

8.1 Phép thử liên phòng thí nghiệm

Chi tiết về phép thử liên phòng thí nghiệm quốc tế về độ chụm của phương pháp được tóm tắt trong Phụ lục A. Giá trị thu được từ phép thử này có thể không áp dụng được cho dãy nồng độ và chất nền khác.

8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được của hai lần thử nghiệm riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, dùng 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 như sau:

Các giá trị đối với ngô:

Aflatoxin B_1:	$\bar{x}$ = 14,9 µg/kg	r = 2,4 µg/kg
Aflatoxin B_2:	$\bar{x}$ = 1,4 µg/kg	r = 1,0 µg/kg
Aflatoxin G_1:	$\bar{x}$ = 7,2 µg/kg	r = 1,9 µg/kg
Aflatoxin G_2:	$\bar{x}$ = 1,1 µg/kg	r = 0,6 µg/kg
Tổng aflatoxin:	$\bar{x}$ = 24,5 µg/kg	

Các giá trị đối với bơ lạc:

Aflatoxin B_1:	$\bar{x}$ = 5,3 µg/kg	r = 2,2 µg/kg
Aflatoxin B_2:	$\bar{x}$ = 0,6 µg/kg	r = 0,3 µg/kg
Aflatoxin G_1:	$\bar{x}$ = 2,3 µg/kg	r = 1,5 µg/kg
Aflatoxin G_2:	$\bar{x}$ = 0,2 µg/kg	r = 0,5 µg/kg
Tổng aflatoxin:	$\bar{x}$ = 8,4 µg/kg	

Các giá trị đối với lạc:

Aflatoxin B_1:	$\bar{x}$ = 9,7 µg/kg	r = 1,5 µg/kg
Aflatoxin B_2:	$\bar{x}$ = 1,1 µg/kg	r = 0,7 µg/kg
Aflatoxin G_1:	$\bar{x}$ = 4,5 µg/kg	r = 0,8 µg/kg
Aflatoxin G_2:	$\bar{x}$ = 0,7 µg/kg	r = 0,8 µg/kg
Tổng aflatoxin:	$\bar{x}$ = 16 µg/kg	

8.3 Độ tái lập

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

Các giá trị đối với ngô:

Aflatoxin B_1: $\bar{x}$ = 14,9 µg/kg R = 4,2 µg/kg

Aflatoxin B_2: $\bar{x}$ = 1,4 µg/kg R = 1,2 µg/kg

Aflatoxin G_1: $\bar{x}$ = 7,2 µg/kg R = 1,9 µg/kg

Aflatoxin G_2: $\bar{x}$ = 1,1 µg/kg R = 1,5 µg/kg

Tổng aflatoxin: $\bar{x}$ = 24,5 µg/kg

Các giá trị đối với bơ lạc:

Aflatoxin B_1: $\bar{x}$ = 5,3 µg/kg R = 4,4 µg/kg

Aflatoxin B_2: $\bar{x}$ = 0,6 µg/kg R = 0,6 µg/kg

Aflatoxin G_1: $\bar{x}$ = 2,3 µg/kg R = 2,0 µg/kg

Aflatoxin G_2: $\bar{x}$ = 0,2 µg/kg R = 0,7 µg/kg

Tổng aflatoxin: $\bar{x}$ = 8,4 µg/kg

Các giá trị đối với lạc:

Aflatoxin B_1: $\bar{x}$ = 9,7 µg/kg R = 4,5 µg/kg

Aflatoxin B_2: $\bar{x}$ = 1,1 µg/kg R = 1,2 µg/kg

Aflatoxin G_1: $\bar{x}$ = 4,5 µg/kg R = 1,9 µg/kg

Aflatoxin G_2: $\bar{x}$ = 0,7 µg/kg R = 1,4 µg/kg

Tổng aflatoxin: $\bar{x}$ = 16 µg/kg

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp được sử dụng;
- kết quả thu được và đơn vị tính;
- ngày lấy mẫu và phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- ngày nhận mẫu của phòng thử nghiệm;
- ngày thử nghiệm;
- mọi điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong phương pháp này hoặc những điều được coi là tuỳ 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 tổ chức bởi AOAC và IUPAC theo ISO 5725:1986. Các mẫu ngô, lạc và bơ lạc bị nhiễm tự nhiên và được bổ sung tổng aflatoxin ở mức 10 µg/kg, 20 µg/kg và 30 µg/kg theo tỉ lệ 7:1:3:1 tương ứng với B_1, B_2, G_1 và G_2.

Bảng A.1 – Dữ liệu về độ chụm của ngô

Thông số	Aflatoxin				
	B_1	B_2	G_1	G_2	Tổng
Năm tiến hành thử nghiệm liên phòng	1989	1989	1989	1989	1989
Số lượng phòng thử nghiệm	10	10	10	10	10
Số mẫu	1	1	1	1	1
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ loại lệ	9	9	9	10	9
Số lượng ngoại lệ	1	1	1	0	1
Số kết quả được chấp nhận	18	18	18	20	18
Giá trị trung bình $\bar{x}$, µg/kg	14,88	1,38	7,18	1,05	24,49
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r, µg/kg	0,68	0,35	0,68	0,20	1,79
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, RSD_r, %	5,8	25	9,5	19	7,3
Giới hạn lặp lại r, (r = 2,8 x s_r), µg/kg	2,4	0,98	1,90	0,56	5,0
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R, µg/kg	1,50	0,41	0,68	0,53	2,86
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, RSD_R, %	10	30	9,5	51	11,7
Giới hạn tái lập R, (R = 2,8 x s_R) µg/kg	4,20	1,15	1,90	1,48	8,01
Độ thu hồi, %	85	55	96	42	81