

TCVN 6685 : 2000

ISO 14501 : 1998

SỮA VÀ SỮA BỘT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG  
AFLATOXIN  $M_1$  – LÀM SẠCH BẰNG SẮC KÝ  
CHỌN LỌC VÀ XÁC ĐỊNH BẰNG SẮC KÝ  
LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

*Milk and milk powder – Determination of aflatoxin  $M_1$  content –  
Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination  
by high-performance liquid chromatography*

HÀ NỘI – 2000

## Lời nói đầu

TCVN 6685 : 2000 hoàn toàn tương đương với ISO 14501 : 1998

TCVN 6685 : 2000 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

**Sữa và sữa bột – Xác định hàm lượng aflatoxin-M<sub>1</sub>**

Làm sạch bằng sắc ký chọn lọc và xác định  
bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

*Milk and milk powder – Determination of aflatoxin M<sub>1</sub> content –  
Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination  
by high-performance liquid chromatography*

**Cảnh báo**

- 1) Phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này có sử dụng đến các dung dịch clorofoc và aflatoxin M<sub>1</sub>. Clorofoc là một chất làm suy giảm tầng ozon. Aflatoxin là chất gây ung thư cho người. Cần chú ý tới thông báo của Tổ chức nghiên cứu ung thư Thế giới (WHO) [4, 5].
- 2) Phòng thí 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, thí dụ như được bọc trong giấy nhôm.
- 3) Các dụng cụ thủy tinh (thí 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. Hơn nữa, các dụng cụ thủy tinh mới của phòng thí nghiệm sẽ tiếp xúc với các dung dịch aflatoxin nên được ngâm vài giờ trong axit loãng (thí dụ, axit sunfuric 2 mol/l), rồi tráng kỹ bằng nước cất để loại bỏ hết các vết axit (kiểm tra để đảm bảo là pH trong khoảng từ 6 đến 8).
- 4) Cần tiến hành xử lý tốt tất cả các chất thải phòng thí nghiệm như các hợp chất rắn, dung môi hữu cơ, dụng cụ thủy tinh, các dung dịch lỏng, các chất rơi rớt trong khi tiến hành. Qui trình khử nhiễm này đã được xây dựng và hợp thức hoá trong một chương trình của Tổ chức nghiên cứu ung thư Thế giới (WHO) [4, 5].

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub> trong sữa và sữa bột. Giới hạn phát hiện thấp nhất 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.

## 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1 Hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub>: Khối lượng của chất xác định được bằng qui trình qui định trong tiêu chuẩn này.

Chú thích – Hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub> được biểu thị bằng microgam trong một lít hoặc microgam trong một kilogam.

## 3 Nguyên tắc

Cho phần mẫu thử đi qua cột sắc ký chọn lọc để chiết tách aflatoxin M<sub>1</sub>. Cột này có chứa các kháng thể nhất định 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 M<sub>1</sub> 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 M<sub>1</sub> khỏi cột và thu lấy dung môi rửa giải. Lượng aflatoxin M<sub>1</sub> có mặt trong dung môi rửa giải được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) có detector huỳnh quang.

## 4 Thuốc thử

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

### 4.1 Cột sắc ký chọn lọc

Cột sắc ký chọn lọc phải chứa các kháng thể đối với aflatoxin M<sub>1</sub>. Cột phải có dung tích tối đa không nhỏ hơn 100 ng aflatoxin M<sub>1</sub> (tương ứng với 2 µg/l khi sử dụng cho 50 ml phần mẫu thử) và cho hệ số qui hồi không nhỏ hơn 80% đối với aflatoxin M<sub>1</sub> 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 chọn lọc nào thoả mãn các yêu cầu trên. Tính năng của các cột phải được kiểm tra thường xuyên và ít nhất là một lần đối với mỗi loại cột (xem 4.1.1 và 4.1.2).

#### 4.1.1 Kiểm tra năng lực

Dùng pipet (5.4) lấy 1,0 ml dung dịch aflatoxin  $M_1$  gốc (4.5.2) cho vào ống nghiệm hình nón dung tích 20ml (5.9). Dùng dòng khí nitơ không đổi (4.3) cho dung dịch bay hơi từ từ đến khô và hoà tan cạn thu được trong 10 ml dung dịch axetonitril 10% (4.2.2). Lắc mạnh.

Cho dung dịch này vào 40 ml nước. Trộn kỹ và cho toàn bộ thể tích này lên cột sắc ký chọn lọc. Chú ý sử dụng cột đúng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Rửa cột, rửa giải độc tố và xác định lượng chất liên kết với cột bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sau khi đã pha loãng thích hợp dung môi rửa giải cuối cùng.

Tính hệ số qui hồi đối với aflatoxin. So sánh kết quả này với yêu cầu trong 4.1.

#### 4.1.2 Kiểm tra hệ số qui hồi

Dùng một pipet (5.4) để pha loãng 0,8 ml dung dịch làm việc 0,005  $\mu\text{g/ml}$  aflatoxin  $M_1$  (4.5.3) trong 10 ml nước. Trộn kỹ và cho toàn bộ thể tích này lên cột sắc ký chọn lọc. Chú ý sử dụng cột đúng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Rửa cột, rửa giải độc tố và xác định chất liên kết với cột bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao sau khi đã pha loãng thích hợp dung môi rửa giải cuối cùng. Tính hệ số qui hồi đối với aflatoxin. So sánh kết quả này với yêu cầu trong 4.1.

4.2 Axetonitril tinh khiết, loại dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao.

4.2.1 Axetonitril trong nước, dung dịch 25% theo thể tích.

Cho 250 ml axetonitril (4.2) vào 750 ml nước (đuổi khí trước khi dùng).

4.2.2 Axetonitril trong nước, dung dịch 10% theo thể tích.

Cho 100 ml axetonitril (4.2) vào 900 ml nước (đuổi khí trước khi dùng).

4.3 Khí nitơ

4.4 Clorofoc, được ổn định bằng 0,5% đến 1,0% etanol (theo khối lượng).

4.5 Dung dịch chuẩn aflatoxin  $M_1$

4.5.1 Dung dịch hiệu chuẩn

Dung dịch chuẩn aflatoxin  $M_1$  trong clorofoc có nồng độ 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Xác định nồng độ bằng cách đo độ hấp thụ của nó ở bước sóng hấp thụ cực đại như sau.

Sử dụng phổ kế (5.11), ghi lại độ hấp thụ của dung dịch hiệu chuẩn dựa trên clorofoc làm mẫu trắng, ở bước sóng từ 340 nm đến 370 nm. Đo độ hấp thụ, A, ở bước sóng có độ hấp thụ cực đại,  $\lambda_{\text{max}}$ , gần 360 nm. Tính nồng độ,  $c_1$ , bằng microgam trên mililit, theo công thức sau :

$$c_i = A \times M \times 100 / \varepsilon$$

trong đó

A là giá trị độ hấp thụ ở  $\lambda_{\max}$ ;

M là phân tử lượng của aflatoxin M<sub>1</sub>, tính bằng gam trên mol (M = 328 g/mol);

$\varepsilon$  là hệ số hấp thụ của độc tố trong clorofoc, tính bằng mét vuông trên mol ( $\varepsilon = 1995 \text{ m}^2/\text{mol}$ ).

#### 4.5.2 Dung dịch gốc

Sau khi kiểm tra nồng độ của dung dịch hiệu chuẩn (4.5.1), pha loãng dung dịch hiệu chuẩn trong clorofoc để có được dung dịch gốc aflatoxin M<sub>1</sub> 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Dung dịch gốc 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 dưới 5°C, nơi tối. Trong các điều kiện này, dung dịch gốc có thể ổn định khoảng 2 tháng. Sau 2 tháng, phải kiểm tra lại độ ổn định.

#### 4.5.3 Dung dịch làm việc aflatoxin M<sub>1</sub>

Trước khi chuẩn bị các dung dịch làm việc từ dung dịch chuẩn aflatoxin M<sub>1</sub>, để dung dịch gốc (4.5.2) ở nhiệt độ môi trường trước khi lấy phần dung dịch để pha loãng tiếp. Chuẩn bị các dung dịch làm việc trong ngày sử dụng.

Chuẩn bị dung dịch có nồng độ 0,005  $\mu\text{g/ml}$  như sau : dùng pipet (5.4) lấy 1,0 ml dung dịch gốc (4.5.2) cho vào một ống hình nón dung tích 20 ml (5.9). Cho dung dịch bay hơi đến khô bằng luồng khí nitơ nhẹ (4.3) và hoà tan cạn thu được trong 20,0 ml axetonitril loãng (4.2.2). Cứ 30 phút, lại lắc bình.

Cần chú ý khi cho dung dịch bay hơi đến khô để đảm bảo nhiệt độ không hạ quá thấp, để hơi nước không bị ngưng tụ.

Dùng dung dịch đã pha loãng này để chuẩn bị một loạt các dung dịch pha loãng aflatoxin M<sub>1</sub> chuẩn thích hợp, tùy thuộc vào thể tích vồng bơm để có được 0,05 ng, 0,1 ng, 0,2 ng và 0,4 ng aflatoxin M<sub>1</sub>. Pha loãng bằng dung dịch axetonitril loãng (4.2.2).

### 5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị phòng thí nghiệm thông thường và đặc biệt như sau:

#### 5.1 Xylanh sử dụng một lần, dung tích 10 ml và 50 ml.

- 5.2 Hệ thống hút chân không, (thí dụ, bình Buchner, hệ thống Vac-Elute<sup>1)</sup> hoặc bơm nhu động).
- 5.3 Máy ly tâm, có thể tạo gia tốc quay 4 000 x g.
- 5.4 Pipet, dung tích 1,0 ml, 2,0 ml và 50,0 ml.
- 5.5 Cốc thủy tinh có mỏ, dung tích 250 ml.
- 5.6 Bình định mức, dung tích 100 ml.
- 5.7 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì ở 30°C ± 2°C, 50°C ± 2°C và từ 35°C đến 37°C.
- 5.8 Giấy lọc (loại Whatman No.4<sup>1)</sup>, 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.
- 5.10.1 Bơm không có xung, thích hợp đối với tốc độ dòng ổn định khoảng 1 ml/phút.
- 5.10.2 Hệ thống bơm mẫu, có vòng thể tích bơm cố định hoặc có thể thay đổi, để bơm được từ 50 µl đến 500 µl.
- 5.10.3 Cột phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo, nhồi bằng octadexyl silicagel có kích thước hạt là 3 µm hoặc 5 µm cộng với cột bảo vệ được nhồi đầy bằng chất liệu pha đảo.
- 5.10.4 Detector huỳnh quang, có bước sóng kích thích 365 nm và bước sóng phát xạ 435 nm cho phép phát hiện (5 x nhiều) aflatoxin M<sub>1</sub> khi bơm 0,02 ng trong các điều kiện sắc ký thích hợp.
- 5.10.5 Thiết bị ghi đồ thị dải, 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.
- 5.11 Phổ kế, có thể đo ở các bước sóng từ 200 nm đến 400 nm, có các cuvet mặt bằng thạch anh có chiều dài quang học 1 cm.
- 5.12 Cân, có thể cân chính xác đến 0,1 g với số đọc đến 0,01 g.

## 6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 : 1998 (ISO 707).

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

<sup>1)</sup> Hệ thống Vac-Elute và Whatman là một thí dụ về sản phẩm bán sẵn thích hợp. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không được tổ chức tiêu chuẩn hoá Quốc tế xác nhận.

## 7 Cách tiến hành

### 7.1 Khái quát

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

Các phương pháp hoàn nguyên sữa bột, nạp lên cột sắc ký chọn lọc, rửa cột và rửa giải cột có hơi khác nhau giữa các nhà sản xuất cột. Các hướng dẫn sử dụng cột cụ thể phải được thực hiện một cách chính xác. Nhìn chung, các qui trình đòi hỏi phải hoàn nguyên sữa bột bằng nước hoặc dung dịch đệm muối, li tâm, nạp cột dưới áp suất (có khả năng được rửa trước), rửa cột bằng nước và rửa giải aflatoxin bằng metanol hoặc axetonitril. Nên tuân thủ các hướng dẫn về tốc độ dòng.

### 7.2 Chuẩn bị mẫu thử

#### 7.2.1 Sữa

Làm ấm mẫu sữa đến nhiệt độ từ 35°C đến 37 °C trong nồi cách thuỷ (5.7). Lọc sữa qua giấy lọc (5.8) (nếu cần thì sử dụng vải bộ lọc), hoặc li tâm ở tốc độ 4 000 x *g* trong 15 phút. Thu lấy ít nhất 50 ml sữa đã được xử lý. Tiếp tục theo qui định trong 7.4.

#### 7.2.2 Sữa bột

Cân 10 g mẫu, chính xác đến 0,1 g cho vào cốc có mỏ dung tích 250 ml (5.5). Lấy 50 ml nước đã được làm ấm đến 50 °C và thêm từ từ vào sữa bột. Dùng que khuấy để trộn hỗn hợp cho đến đồng nhất.

Nếu chưa hoà tan hoàn toàn sữa bột, đặt cốc vào nồi cách thuỷ (5.7) ở 50 °C ít nhất 30 phút. Trộn kỹ.

Để dung dịch nguội đến 20 °C và chuyển hết sang một bình định mức dung tích 100 ml (5.6) dùng một ít nước để tráng. Pha loãng bằng nước đến vạch mức 100 ml. Lọc sữa đã hoàn nguyên qua giấy lọc (5.8) hoặc li tâm ở tốc độ 4 000 x *g* trong 15 phút. Thu lấy ít nhất 50 ml sữa đã được xử lý. Tiếp tục theo qui định trong 7.4.

### 7.3 Chuẩn bị cột sắc ký chọn lọc

Gắn ống xylanh 50 ml (5.1) lên đỉnh cột sắc ký chọn lọc (4.1). Nối đầu dưới cột với hệ thống hút chân không (5.2).

### 7.4 Chiết và làm sạch mẫu thử

Dùng pipet lấy 50 ml mẫu thử đã chuẩn bị (7.2.1 hoặc 7.2.2) cho vào xylanh 50 ml (5.1) và cho đi qua cột sắc ký chọn lọc với tốc độ chậm ổn định từ 2 ml/phút đến 3 ml/phút, dùng hệ thống hút chân không (5.2) để kiểm soát tốc độ.



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

Tháo cột ra khỏi hệ thống hút chân không. Rửa giải aflatoxin  $M_1$  từ từ khỏi cột bằng cách dùng xylanh 10 ml cho 4 ml axetonitril (4.2), đi qua cột trong khoảng 60 giây. Dùng pitong của xylanh để kiểm soát tốc độ dòng. Thu lấy dịch rửa giải vào một ống hình nón (5.9). Thổi nhẹ một luồng khí nitơ (4.3) để giảm thể tích dung môi rửa giải đến  $V_e$  từ 500  $\mu$ l đến 50  $\mu$ l ở 30 °C.

**Cảnh báo :** Nếu cho bay hơi đến khô hoàn toàn thì có thể làm thất thoát aflatoxin  $M_1$ .

Pha loãng thể tích dung môi rửa giải cuối cùng  $V_f$  bằng 10 lần thể tích  $V_e$  (tức là dùng từ 500  $\mu$ l đến 5000  $\mu$ l bằng nước, xem chú thích).

Chú thích - Nếu hàm lượng axetonitril của chất chiết được bơm chứa aflatoxin  $M_1$  vượt quá 10% giới hạn, thì trong sắc đồ HPLC sẽ xuất hiện việc giãn rộng pic. Tuy nhiên, hàm lượng nước trên 90% sẽ không ảnh hưởng lên hình dạng của pic [8].

## 7.5 Sắc ký lỏng hiệu năng cao

### 7.5.1 Chuẩn bị bơm

Bơm dung môi rửa giải (4.2.1) với tốc độ dòng ổn định qua cột của máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Nếu cần (tùy thuộc loại cột được sử dụng), có thể điều chỉnh tỷ lệ axetonitril - nước của dung môi rửa giải HPLC (4.2.1) để tách hết aflatoxin  $M_1$  khỏi các thành phần khác.

Tốc độ dòng của dung môi rửa giải (4.2.1) cũng phụ thuộc vào cột (5.10.3). Theo hướng dẫn về cột thông thường (có chiều dài khoảng 25 cm và đường kính trong khoảng 4,6 mm), tốc độ dòng chảy khoảng 1 ml/phút sẽ cho kết quả tối ưu; đối với các cột HPLC có đường kính trong 3 mm thì tốc độ dòng chảy khoảng 0,5 ml/phút cho kết quả tối ưu.

Để đạt các điều kiện tối ưu cụ thể, nên sử dụng một dịch chiết mẫu (tốt nhất là không chứa aflatoxin  $M_1$ ) bơm riêng rẽ và bơm kết hợp với chuẩn aflatoxin  $M_1$ .

### 7.5.2 Chạy sắc ký

Kiểm tra độ tuyến tính của các lần bơm dung dịch chuẩn và độ ổn định của hệ thống sắc ký. Bơm lặp lại một dung dịch chuẩn aflatoxin  $M_1$  (một lượng cố định) cho đến khi đạt được diện tích pic hoặc chiều cao pic không đổi. Các lần bơm liên tiếp không được sai khác quá 5% tính theo diện tích pic hoặc chiều cao pic.

Thời gian lưu aflatoxin  $M_1$  phụ thuộc vào nhiệt độ. Do đó phải hiệu chỉnh lại sai lệch trong hệ thống detector. Bằng cách bơm một lượng cố định dung dịch chuẩn aflatoxin  $M_1$  theo từng khoảng thời gian đều đặn, các kết quả của những dung dịch chuẩn này có thể được hiệu chỉnh cho độ lệch quan sát thấy.

### 7.5.3 Dụng đường chuẩn aflatoxin M<sub>1</sub>

Bơm lần lượt các dung dịch chuẩn aflatoxin M<sub>1</sub>, tùy thuộc thể tích của vòng bơm, lấy một thể tích thích hợp, V<sub>i</sub>, có chứa tương ứng 0,05 ng, 0,1 ng, 0,2 ng và 0,4 ng aflatoxin M<sub>1</sub>. Dụng đồ thị chuẩn theo diện tích pic hoặc độ cao pic tương ứng với khối lượng aflatoxin M<sub>1</sub> được bơm.

### 7.5.4 Phân tích các dịch chiết đã làm sạch và sơ đồ bơm

Bơm một thể tích thích hợp, V<sub>i</sub>, của dung môi rửa giải (7.4) vào thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao qua vòng bơm. Tách tất cả aflatoxin M<sub>1</sub> 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 nên cứ sau năm lần bơm dung môi rửa giải mẫu, bơm xen kẽ một dung dịch chuẩn aflatoxin M<sub>1</sub>.

Xác định diện tích hoặc độ cao pic aflatoxin M<sub>1</sub> của dung môi rửa giải mẫu. Dựa vào đồ thị chuẩn, xác định khối lượng aflatoxin M<sub>1</sub> (ng) có trong thể tích dịch chiết mẫu được bơm.

Nếu diện tích pic hoặc độ cao pic của aflatoxin M<sub>1</sub> trong dung môi rửa giải mẫu lớn hơn diện tích pic hoặc độ cao pic của dung dịch chuẩn cao nhất, thì pha loãng định lượng dung môi rửa giải bằng nước và bơm lại dịch chiết đã pha loãng này vào thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao.

## 8 Tính toán và biểu thị kết quả

### 8.1 Sữa

#### 8.1.1 Tính toán

Tính hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub> của mẫu thử, w<sub>m</sub>, bằng microgam trên lít, theo công thức sau :

$$w_m = m_A \times (V_f / V_i) \times (1/V)$$

trong đó

m<sub>A</sub> là khối lượng aflatoxin M<sub>1</sub> tương ứng với diện tích hoặc độ cao pic của dung môi rửa giải mẫu, tính bằng nanogam;

V<sub>i</sub> là thể tích dung môi rửa giải mẫu được bơm, tính bằng microlit;

V<sub>f</sub> là thể tích cuối cùng của dung môi rửa giải mẫu, tính bằng microlit;

V 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 bằng microgam trên lít, tính đến ba chữ số sau dấu phẩy.

## 8.2 Sữa bột

### 8.2.1 Tính toán

Tính hàm lượng aflatoxin  $M_1$  của mẫu thử,  $w_p$ , bằng microgam trên kilogam, theo công thức sau :

$$w_p = m_A \times (V_f / V_i) \times (1/m)$$

trong đó

$m$  là khối lượng sữa bột trong 50 ml dung dịch thử đã chuẩn bị (7.4), tính bằng gam;

$m_A$ ,  $V_f$  và  $V_i$  giống như trong 8.1.1.

Công thức này chỉ có thể áp dụng được khi không pha loãng dung dịch, ngoài ra đối với các dung dịch khác thì độ pha loãng phải được đưa vào khi tính toán.

### 8.2.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả bằng microgam trên kilogam, tính đến ba chữ số sau dấu phẩy.

## 9 Độ chính xác

Các chi tiết của một thử nghiệm liên phòng thí nghiệm về độ chính xác được tóm tắt trong phụ lục A. Các giá trị thu được từ thử nghiệm liên phòng thí nghiệm này có thể không áp dụng được cho các khoảng nồng độ và chất nền khác với những điều đã nêu.

## 10 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ rõ :

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

## Phụ lục A

(tham khảo)

## Các kết quả thử liên phòng thí nghiệm

Một thử nghiệm liên phòng thí nghiệm gồm 16 phòng thí nghiệm tham gia, tiến hành trên các mẫu sữa bột có hàm lượng chất béo thấp (1%) và có hàm lượng chất béo cao (28%). Các mẫu sữa bột có hàm lượng chất béo cao được giữ lại để chuẩn bị làm mẫu chuẩn đối chiếu [6], vì hàm lượng aflatoxin M<sub>1</sub> đã biết.

Đối với sữa bột bị nhiễm thì các mức aflatoxin M<sub>1</sub> biến động từ 0,08 µg/kg đến 0,6 µg/kg, tức là từ 8 ng/l đến 60 ng/l đối với sữa hoàn nguyên.

Các kết quả thu được đã được phân tích thống kê theo ISO 5725-1 và 5725-2 [2; 3] cho các số liệu về độ chính xác như trong bảng A.1.

Chú thích – Các số liệu của thử nghiệm này đã được công bố trong tài liệu tham khảo [7] và [8].

Bảng A.1 - Các số liệu về độ chính xác

Mẫu	1	2	3	4	5
Số phòng thí nghiệm <sup>a)</sup>	12	4	13	11	14
Giá trị trung bình (ng/kg)	81	150	80	202	580
Giới hạn độ lặp lại, r, (ng/kg)	23	60,1	15	27	203
Giới hạn độ tái lập, R, (ng/kg)	52	98	41	61	310
Hệ số biến thiên của độ lặp lại (%)	9,9	14,0	6,8	4,7	12,5
Hệ số biến thiên của độ tái lập (%)	23	22,7	18,3	10,8	19,1
a) Không thông báo số phòng thí nghiệm không đạt.					

## Tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 : 1998 (ISO 707 : 1997) Sữa và sản phẩm sữa – Các phương pháp lấy mẫu.
- [2] ISO 5725-1 : 1994 Độ chính xác của các phương pháp đo và kết quả – Phần 1 : Nguyên tắc chung và định nghĩa.
- [3] ISO 5725-2 : 1994 Độ chính xác của các phương pháp đo và kết quả – Phần 2 : Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo chuẩn.
- [4] Khử nhiễm phòng thí nghiệm và phá huỷ aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> và G<sub>2</sub> 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 M<sub>1</sub> 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 M<sub>1</sub> 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 M<sub>1</sub> 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.