

**TCVN 6953 : 2001**

**ISO 14718 : 1998**

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG  
AFLATOXIN B<sub>1</sub> TRONG THỨC ĂN HỖN HỢP -  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Animal feeding stuffs  
Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> content of mixed feeding stuffs  
Method using high-performance liquid chromatography*

**HÀ NỘI - 2001**

## **Lời nói đầu**

TCVN 6953 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 14718 : 1998.

TCVN 6953 : 2001 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F17 Thức ăn chăn nuôi biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

# Thức ăn chăn nuôi - Xác định hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong thức ăn hỗn hợp - Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Animal feeding stuffs Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> content of mixed feeding stuffs  
Method using high-performance liquid chromatography*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong thức ăn chăn nuôi bao gồm cả những thức ăn chăn nuôi có chứa bã cam quýt.

Giới hạn xác định thấp nhất là 1 µg/kg.

Chú thích 1 - Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để xác định hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của nguyên liệu thô và thức ăn chăn nuôi như gluten ngô, lạc nhân, hạt cọ dầu, củi dừa khô, bã cam quýt, bột tapioca, đậu tương, cám gạo, phấn hoa, hạt cải dầu, hạt bông (xem tài liệu tham khảo [1] và [2]). Tuy nhiên, những loại này không nằm trong thử nghiệm phối hợp của phương pháp.

Chú thích 2 - Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng để xác định tổng hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub>. Tuy nhiên thông số này chưa được khẳng định với phương pháp thử nghiệm phối hợp này.

## 2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6952 : 2001 (ISO 6498 : 1998) Thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bổ sung thô.

## 3 Nguyên tắc

Chiết mẫu bằng clorofooc. Phần chiết được lọc và phần dịch lọc được làm sạch trên cột Florisil®<sup>1)</sup> và cột C<sub>18</sub>. Sự xác định và phân tách cuối cùng thu được bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) dùng cột C<sub>18</sub> pha ngược, dẫn xuất hoá sau cột bằng iốt hoặc brom, sử dụng detector huỳnh quang.

<sup>1)</sup> Florisil® là tên thương mại của sản phẩm. Thông tin rất tiện lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này nhưng không phải là sự xác nhận của ISO đối với sản phẩm này. Những sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng cho những kết quả tương tự.

## 4 Thuốc thử và hóa chất

Chỉ dùng những thuốc thử được công nhận đạt chất lượng phân tích.

**4.1 Nước:** đã loại khoáng hoặc khử ion, điện trở suất ít nhất là 10 MΩ cm, hoặc ít nhất nước có độ tinh khiết tương đương.

**4.2 Axit sunfuric đậm đặc:**  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 18 \text{ mol/l}$ ,  $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$ .

**4.3 Axit sunfuric:**  $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$ .

Thêm từ từ 105 ml axit sunfuric đậm đặc (4.2) vào 895 ml nước, khuấy đều. Tránh làm dung dịch quá nóng.

### 4.4 Mẫu kiểm tra

Chuẩn bị mẫu kiểm tra gồm khoảng 2 kg thức ăn chăn nuôi có chứa khoảng 5 µg/kg aflatoxin B<sub>1</sub> bằng cách trộn đều những mẫu đã xác định trước với 5 µg/kg aflatoxin B<sub>1</sub>.

Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của mẫu kiểm tra do hai người phân tích tiến hành xác định 5 lần theo qui trình mô tả ở điều 8. Từ kết quả hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trung bình, độ lệch chuẩn và hệ số biến động sẽ được tính toán.

**4.5 Celite® 545 đã được rửa axit**, hoặc sản phẩm có chất lượng tương đương<sup>2)</sup>.

**4.6 Cột loại Florisil® Sep-Pak, Waters No.51960**, hoặc sản phẩm có chất lượng tương đương<sup>3)</sup>.

**4.7 Cột loại Sep-Pak C<sub>18</sub>, Waters No. 51910**, hoặc sản phẩm có chất lượng tương đương<sup>3)</sup>.

**4.8 Axeton.**

**4.9 Metanol.**

**4.10 Axetonitril.**

**4.11 Clorofooc**, được ổn định với etanol (tỷ lệ khối lượng 0,5 % đến 1%).

---

<sup>2)</sup> Celite® là tên thương mại của sản phẩm.

<sup>3)</sup> Florisil® là tên thương mại của sản phẩm. Loại cột Florisil® Sep-Pak có số hạt nhồi là 51960 và loại cột C<sub>18</sub> Sep-Pak có số hạt nhồi là 51910, của Hiệp hội Nước (Milwaukee, USA), là ví dụ về những sản phẩm phù hợp sẵn có.

Thông tin đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, và không phải là sự xác nhận của tiêu chuẩn đối với chất lượng của chúng. Những sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng cho những kết quả tương tự.

**Cảnh báo - Clorofoc là một chất độc. Tránh hít phải và tiếp xúc trực tiếp với clorofoc. Khi làm việc với dung môi và các dung dịch phải tiến hành trong tủ hút.**

Đặc tính hấp phụ của cột Florisil® (4.6) có thể biến đổi nếu sử dụng chất ổn định không phải là etanol. Nếu không dùng clorofoc, đặc tính hấp phụ phải được kiểm tra theo điều 8.

**4.12 Hỗn hợp axeton và nước**, theo tỷ lệ 98 : 2 (theo thể tích).

Trộn 980 ml axeton (4.8) với 20 ml nước (4.1). Lắc đều.

**4.13 Hỗn hợp axeton và nước**, theo tỷ lệ 15 : 85 (theo thể tích).

Trộn 150 ml axeton (4.8) với 850 ml nước (4.1). Lắc đều.

**4.14 Hỗn hợp axeton và nước**, theo tỷ lệ 5 : 95 (theo thể tích).

Trộn 50 ml axeton (4.8) với 950 ml nước (4.1). Lắc đều.

**4.15 Hỗn hợp metanol và nước**, theo tỷ lệ 20 : 80 (theo thể tích).

Trộn 200 ml metanol (4.9) với 800 ml nước (4.1). Lắc đều.

**4.16 Axit nitric đậm đặc**,  $C(\text{HNO}_3) = 14 \text{ mol/l}$ ,  $\rho(\text{HNO}_3) = 1,40 \text{ g/ml}$ , HPLC có dẫn xuất brom.

**4.17 Kali bromua (KBr)**, HPLC có dẫn xuất brom.

#### **4.18 Pha động cho HPLC**

##### **4.18.1 Pha động cho HPLC với dẫn xuất hoá bằng iốt**

Trộn 120 ml axetonitril (4.10) với 210 ml metanol (4.9) và 390 ml nước (4.1), lắc đều. Lọc dung môi rửa giải qua màng lọc PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ , sử dụng hệ thống lọc dung môi (5.1) và trước khi dùng, loại khí trong bể siêu âm 10 phút (5.2) trước khi dùng.

Chú thích - Thành phần dung môi pha động có thể cần được điều chỉnh phụ thuộc vào đặc tính của cột HPLC sử dụng.

##### **4.18.2 Pha động cho HPLC với dẫn xuất hoá bằng brom**

Trộn 400 ml axetonitril (4.10) với 700 ml metanol (4.9) và 1300 ml nước (4.1), lắc đều. Thêm vào hỗn hợp 286 mg kali bromua (4.17) và 152  $\mu\text{l}$  axit nitric đậm đặc (4.16). Lắc đều và loại khí bằng dòng khí trơ trong 15 phút.

##### **4.19 Dung dịch iốt bão hòa cho HPLC với dẫn xuất hoá bằng iốt**

Cho 2 g iốt vào 400 ml nước. Khuấy đều ít nhất trong 90 phút và lọc qua màng lọc PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  (xem 5.1). Chuẩn bị dung dịch ngay trong ngày sử dụng.

## TCVN 6953 : 2001

Bảo vệ dung dịch bảo hòa khỏi ánh sáng để tránh hiện tượng quang phân hủy.

**4.20 Dung dịch natri hipoclorit**, (chất thường dùng)  $\rho(\text{clo hoạt tính}) = 100 \text{ g/l}$ .

**4.21 Dung dịch natri hipoclorit**, tỷ lệ thể tích 1 %.

Pha 10 ml dung dịch natri hipoclorit (4.20) với 990 ml hỗn hợp nước-axeton (4.14).

**4.22 Khí trơ**, ví dụ khí nitơ.

**4.23 Chất tiêu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub>** (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), 2,3,6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -tetrahydro-4-methoxycyclopenta[c]furo [3', 2': 4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione; Cơ quan Đăng ký Những chất chiết dùng cho Hóa học (CAS) số 1162-65-8.

### Cảnh báo

- 1. Mycotoxin là chất cực kỳ độc. Mọi thao tác phải tiến hành trong tủ hút. Thực hiện các biện pháp phòng ngừa đặc biệt khi chất độc ở dạng khô vì chúng có bản chất tĩnh điện và vì vậy mycotoxin có xu hướng tự phát tán trong môi trường làm việc.**
- 2. Aflatoxin rất nhạy với bức xạ UV. Vì vậy, khi tiến hành mọi thao tác phải tránh ánh sáng mặt trời hoặc ánh sáng trắng nhân tạo. Cần đảm bảo chiếu sáng đầy đủ nhưng không quá chói bằng đèn dây tóc vonfram. Có thể dùng những đèn tỏa nhiệt lượng ít và đèn ống huỳnh quang, nên sử dụng đồ thủy tinh có màu hổ phách (lọ, bình định mức).**
- 3. Những đồ thủy tinh tiếp xúc trực tiếp với dung dịch aflatoxin B<sub>1</sub> trước khi rửa phải được ngâm qua đêm trong dung dịch hipoclorit (4.21) để loại bỏ hoàn toàn các vết aflatoxin B<sub>1</sub>.**

**4.24 Dung dịch tiêu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub>**,  $\rho(\text{aflatoxin B}_1) \approx 10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ .

Cho toàn bộ một ống (ampul) aflatoxin B<sub>1</sub> (4.23) vào bình và hòa tan trong clorofooc (4.11). Chuyển dung dịch vào bình định mức có dung tích phù hợp và pha loãng đến vạch bằng clorofooc để thu được một dung dịch có chứa hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> khoảng 10  $\mu\text{g/ml}$ . Lắc đều.

Chuyển dung dịch vào bình có màu hổ phách hoặc chai nút xoáy kín khí và bảo quản ở nơi mát (4°C) trong chỗ tối, được bịt chặt và bọc bằng giấy nhôm.

**4.25 Dung dịch tiêu chuẩn gốc aflatoxin B<sub>1</sub>**

Chuyển 2,5 ml dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> (4.24) vào bình định mức dung tích 50 ml và pha loãng đến vạch bằng clorofooc (4.11).

Chuyển dung dịch vào bình có màu hổ phách hoặc chai nút xoáy, kín khí và bảo quản ở nơi mát (4°C) trong chỗ tối, bình được bịt chặt và bọc bằng giấy nhôm.

#### 4.26 Dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> dùng cho HPLC

##### 4.26.1 Dung dịch hiệu chuẩn I, $\rho(\text{aflatoxin B}_1) \approx 4 \text{ ng/ml}$ .

Để bình định mức bọc giấy nhôm có chứa dung dịch hiệu chuẩn gốc (4.25) đạt nhiệt độ trong phòng (trong vài giờ).

Chuyển 400  $\mu\text{l}$  dung dịch tiêu chuẩn gốc (tương đương khoảng 200 ng aflatoxin B<sub>1</sub>) vào một bình định mức dung tích 50 ml đã được rửa axit, làm bay hơi dung dịch đến khô bằng dòng khí trơ (4.22). Hòa tan cặn bằng 20 ml hỗn hợp nước-axeton (4.13). Pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp nước-axeton và lắc đều.

##### 4.26.2 Dung dịch hiệu chuẩn II, $\rho(\text{aflatoxin B}_1) \approx 3 \text{ ng/ml}$

Chuyển 7,5 ml dung dịch hiệu chuẩn I (4.26.1) vào một bình định mức dung tích 10 ml đã được rửa axit. Pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp nước-axeton (4.13) và lắc đều.

##### 4.26.3 Dung dịch hiệu chuẩn so sánh, $\rho(\text{aflatoxin B}_1) \approx 2 \text{ ng/ml}$

Chuyển 25 ml dung dịch hiệu chuẩn I (4.26.1) vào một bình định mức dung tích 50 ml đã được rửa axit. Pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp nước-axeton (4.13) và lắc đều.

Dung dịch này được bơm lặp lại trong quá trình sắc ký. (8.5).

##### 4.26.4 Dung dịch hiệu chuẩn III, $\rho(\text{aflatoxin B}_1) \approx 1 \text{ ng/ml}$

Chuyển 2,5 ml dung dịch hiệu chuẩn I (4.26.1) vào một bình định mức dung tích 10 ml đã được rửa axit. Pha loãng đến vạch bằng hỗn hợp nước-axeton (4.13) và lắc đều.

#### 4.27 Dung dịch thử cho sắc ký

Chuẩn bị một ống (ampul) chứa hỗn hợp các aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> và G<sub>2</sub> trong 1 ml clorofooc nồng độ tương ứng xấp xỉ là 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ; 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , và 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Cho toàn bộ hỗn hợp trong ampul vào một ống nghiệm có nút thủy tinh hoặc vào bình có nắp xoáy. Chuyển 40  $\mu\text{l}$  dung dịch này vào một ống nghiệm có nút thủy tinh đã được rửa axit (5.4). Làm bay hơi clorofooc bằng dòng khí trơ (4.22) và hoà tan cặn bằng 10 ml hỗn hợp nước - axeton (4.13).

### 5 Thiết bị, dụng cụ

Trước khi dùng, tất cả đồ thủy tinh tiếp xúc trực tiếp với dung dịch aflatoxin phải được ngâm vài giờ trong axit sunfuric (4.3), sau đó rửa sạch (ví dụ 3 lần) bằng nước để loại bỏ hoàn toàn axit. Kiểm tra tồn dư của axit bằng giấy pH.

Trong thực tế khâu xử lý này rất cần thiết đối với bình đáy tròn của thiết bị cất quay (5.12), các bình định mức, xylanh đo, các bình hoặc ống nghiệm dùng để đựng dung dịch xây dựng đường chuẩn và dịch

## TCVN 6953 : 2001

chiết cuối cùng (đặc biệt bình lấy mẫu tự động) và pipet Pasteur, nếu những dụng cụ này dùng để chuyển dung dịch đường chuẩn hoặc dịch chiết.

Chú thích - Những dụng cụ thủy tinh dùng trong phòng thí nghiệm tiếp xúc trực tiếp với dung dịch aflatoxin phải được ngâm trong axit loãng vì nếu sử dụng những dụng cụ thủy tinh không được ngâm axit có thể làm tổn thất aflatoxin B<sub>1</sub>. Phải đặc biệt chú ý đến những dụng cụ thủy tinh mới và những dụng cụ thủy tinh đã sử dụng như bình lấy mẫu tự động và pipét Pasteur.

Sử dụng những thiết bị dùng trong phòng thí nghiệm sau:

**5.1 Hệ thống lọc dung môi**, phù hợp với màng lọc PTFE có kích thước lỗ 0,45 μm.

**5.2 Bể siêu âm.**

**5.3 Micro si-ranh**, dung tích 100 μl dùng cho chuẩn bị dung dịch đường chuẩn.

Kiểm tra bằng cách cân và độ không chính xác không vượt quá 2 % khối lượng.

**5.4 Ống thủy tinh chuẩn có nắp**, dung tích 10 ml.

**5.5 Phổ kế**, phù hợp với các phép đo trong vùng UV của phổ, gồm các cuvet thạch anh có chiều dài đường quang học là 10 mm ± 0,1 mm.

**5.6 Bình tam giác**, dung tích 500 ml, được làm từ thủy tinh borosilicat, cổ bình rộng và có nút thủy tinh hoặc nút xoáy có lót PTFE.

**5.7 Máy lắc cơ**, lắc theo chiều ngang hoặc chuyển động tịnh tiến với tần số 250 - 300 vòng/phút.

**5.8 Giấy lọc gấp nếp**, đường kính 24 cm.

**5.9 Van đóng ba chạc Luer® bền với clorofooc<sup>4)</sup>.**

**5.10 Siranh bền về mặt hóa học**, dung tích 10 ml có các ống nối Luer® <sup>(4)</sup>.

**5.11 Cột thủy tinh**, có đường kính trong từ 10 - 15 mm, chiều dài khoảng 30 - 50 cm, có nút Luer® <sup>(4)</sup>.

Chú thích - Nếu sử dụng cột thủy tinh có đường kính trong khoảng 10 mm và dài khoảng 30 cm, thì nên dùng bể chứa bằng nhựa (bền về mặt hóa học) ít nhất có dung tích 70 ml.

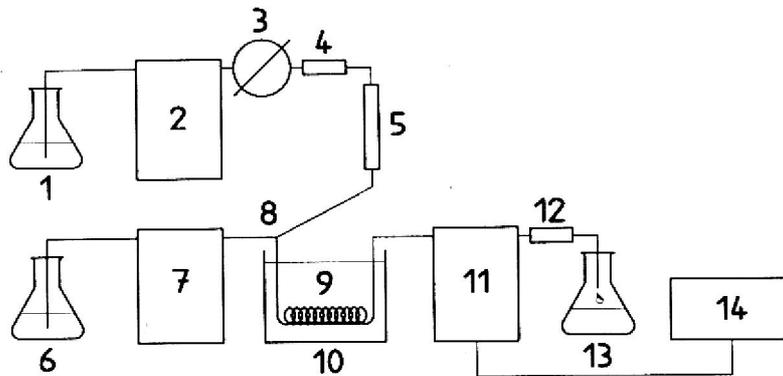
---

<sup>4)</sup> Luer® là tên thương mại của sản phẩm. Thông tin đưa ra tạo điều kiện thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này nhưng không phải là sự xác nhận của tiêu chuẩn đối với chất lượng của chúng. Những sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng cho những kết quả tương tự.

5.12 Thiết bị cất quay chân không, có bình đáy tròn dung tích 150 - 250 ml.

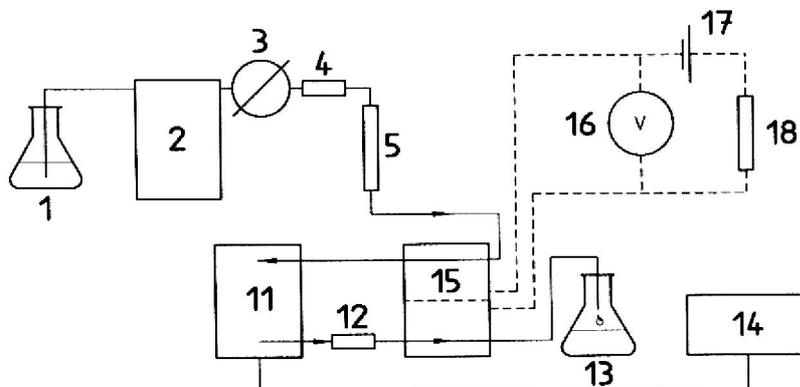
5.13 Hệ thống HPLC

Xem hình 1 và 2 giới thiệu sơ đồ hệ thống HPLC cho dẫn xuất hoá bằng iốt và brom, tương ứng.



- |                          |                             |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1. Pha động trong HPLC   | 10. Cuộn dây phản ứng       |
| 2. Bơm HPLC              | 11. Detector huỳnh quang    |
| 3. Bơm nạp mẫu           | 12. Điện trở                |
| 4. Cột bảo vệ            | 13. Bình chứa dung môi thải |
| 5. Cột phân tích         | 14. Thiết bị ghi/tích phân  |
| 6. Dung dịch iốt bão hòa | 15. Ngăn dẫn xuất (KOBRA®)  |
| 7. Bơm dung môi          | 16. Vôn kế                  |
| 8. Ống nối chữ T         | 17. Nguồn điện, 10 V d.c    |
| 9. Nồi cách thuỷ (60°C)  | 18. Điện trở, 100 kΩ        |

Hình 1 - Sơ đồ giới thiệu hệ thống HPLC cho dẫn xuất hoá bằng iốt



Hình 2 - Sơ đồ giới thiệu hệ thống HPLC cho dẫn xuất hoá bằng brom (xem ghi chú ở sơ đồ 1)

## TCVN 6953 : 2001

**5.13.1 Bơm**, phải ổn định, có khả năng duy trì tốc độ dòng trong khoảng 0,1 ml/phút đến 1,0 ml/phút.

**5.13.2 Bơm nạp mẫu**, có vòng nạp mẫu phù hợp với lượng nạp mẫu là 250 µl.

**5.13.3 Detector huỳnh quang**, kích thích ở bước sóng 365 nm và phát ra ở bước sóng 435 nm (đối với thiết bị lọc có bước sóng phát ra > 400 nm). Có khả năng phát hiện được nồng độ aflatoxin B<sub>1</sub> thấp nhất là 0,05 ng. Có thể dùng áp lực ngược (ví dụ bằng cách dùng một điện trở hoặc một lõi thép không gỉ hoặc polytetrafluoetylen (PTFE) nối với đầu ra của detector) để loại bọt khí trong dòng chảy.

### 5.13.4 Máy ghi

**5.13.5 Cột bảo vệ**, dùng cột C<sub>18</sub> có kích thước hạt nhồi từ 37 - 50 µm, dài 10 - 20 mm, đường kính trong 3,9 mm; hoặc dùng một cột bảo vệ khác có chất lượng tương đương.

**5.13.6 Cột phân tích**, dùng cột C<sub>18</sub> có kích thước hạt nhồi từ 3 - 5 µm, dài 200 mm, đường kính trong 3,0 mm; hoặc dùng một cột bảo vệ khác có chất lượng tương đương.

**5.13.7 Bộ tích phân điện tử** (tùy chọn).

## 5.14 Hệ thống HPLC đối với HPLC với dẫn xuất hoá bằng iốt

**5.14.1 Bơm**, phải ổn định, cung cấp thuốc thử iốt cột cuối.

**5.14.2 Van chữ T có vùng thể tích chết bằng không**, bằng thép không gỉ kích thước 1,59 mm x 0,75 mm.

**5.14.3 Cuộn dây phản ứng hình xoắn ốc**, bằng polytetrafluoetylen (PTFE) hoặc thép không gỉ.

Thực tế cho thấy kích thước 3000 mm x 0,5 mm đến 5000 mm x 0,5 mm phù hợp với cột HPLC có kích thước 5 µm hoặc 3 µm.

**5.14.4 Bồn nước được điều nhiệt hoặc tủ ấm**, được điều chỉnh đến 60°C, có thể chỉnh nhiệt độ chính xác đến 0,1°C.

## 5.15 Hệ thống HPLC đối với HPLC với dẫn xuất hoá bằng brom

**5.15.1 Ngăn điện hóa**, thiết bị brom của Kok (KOBRA®<sup>5)</sup>).

**5.15.2 Nguồn điện**, 0 V đến 20 V một chiều.

**5.15.3 Dụng cụ đo**, dải đo từ 0 V đến 10 V một chiều, trở kháng > 50 kΩ.

---

<sup>5)</sup> KOBRA® là tên thương mại của sản phẩm. Thông tin đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này nhưng không phải là sự xác nhận của tiêu chuẩn đối với chất lượng của chúng. Những sản phẩm tương đương có thể được sử dụng nếu chúng cho những kết quả tương tự.

**5.15.4 Điện trở, 100 kΩ..**

**5.16 Xi-lanh,** thích hợp cho HPLC với lượng mẫu đưa vào 250 µl.

## 6 Lấy mẫu

Phương pháp lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo ISO 6497 [7].

Điều quan trọng là phòng thí nghiệm phải nhận được mẫu có tính đại diện và trung thực, không bị hư hại hoặc bị thay đổi trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 : 2001 (ISO 6498).

Mẫu phòng thí nghiệm được nghiền (thường 500 g) sao cho hoàn toàn lọt qua sàng có đường kính lỗ sàng 1 mm. Trộn đều.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Khái quát

Đối với mỗi lần đo thêm vào mẫu trắng 10 µg/kg aflatoxin B<sub>1</sub> và hóa chất đã được chứng nhận hoặc một mẫu kiểm tra (4.4). Thêm vào mẫu trắng các hóa chất để kiểm tra sự nhiễm bẩn từ dụng cụ thủy tinh.

Kết quả đưa ra sẽ phải phù hợp với quy định tại điều 10.

### 8.2 Xác định phổ hấp thụ của dung dịch tiêu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub>

Xác định phổ hấp thụ dung dịch tiêu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> (4.24) trong cuvet trong khoảng bước sóng 330 nm và 370 nm bằng phổ kế (5.5), lấy clorofooc làm mẫu trắng. Đo độ hấp thụ (A) ở bước sóng 363 nm - gần bước sóng cực đại.

### 8.3 Chiết

Cân 50,0 g (chính xác đến 0,1 g) mẫu thử đã chuẩn bị (xem điều 7) cho vào bình tam giác (5.6). Thêm lần lượt 25 g Celite® (4.5), 250 ml clorofooc (4.11) và 25 ml nước. Để bình cố định, khuấy nhẹ và giải phóng áp suất. Đặt bình vào máy lắc cơ (5.7) và lắc trong 30 phút.

Chú thích - Để giảm thể tích clorofooc sử dụng, có thể dùng một nửa lượng nói trên, nghĩa là 25,0 g mẫu thử đã chuẩn bị (xem điều 7), 12,5 g Celite® (4.5), 125 ml clorofooc (4.11) và 12,5 ml nước.

## **TCVN 6953 : 2001**

Lọc qua giấy lọc gấp nếp (5.8). Nếu quá trình lọc diễn ra chậm, phải bọc toàn bộ phễu để tránh hiện tượng bay hơi clorofooc. Thu 50 ml dịch lọc ( $V_s$ ).

Nếu cần lấy một phần dịch và pha loãng thành 50 ml ( $V_t$ ) bằng clorofooc để lượng aflatoxin B<sub>1</sub> không vượt quá 4 ng/ml.

Dùng dịch lọc của mẫu đã làm sạch theo 8.4.

### **8.4 Làm sạch**

Thực hiện các quá trình liên tục.

#### **8.4.1 Làm sạch Florisil®**

##### **8.4.1.1 Chuẩn bị cột làm sạch**

Gắn van ba chạc (5.9) vào cuối cột Florisil® (4.6). Rửa cột và loại không khí bằng cách lấy 10 ml clorofooc (4.11) và cho nhanh 8 ml qua van và dùng si-ranh (5.10) bơm clorofooc vào cột.

Gắn vào phần dài hơn của cột thủy tinh (5.11) và cho nốt 2 ml clorofooc còn lại qua cột. Khóa van. Bỏ si-ranh ra.

##### **8.4.1.2 Làm sạch**

Cho dịch lọc thu được ( $V_s$  hoặc  $V_t$ ) ở 8.3 vào dây cột và để tự chảy dưới tác dụng của trọng lực. Rửa bằng 5 ml clorofooc (4.11), rửa tiếp bằng 20 ml metanol (4.9), gạn phần dung môi rửa giải ra.

Trong quá trình này phải đảm bảo dây cột không bị khô.

Rửa giải aflatoxin B<sub>1</sub> bằng 50 ml hỗn hợp axeton - nước (4.12) và thu chất rửa giải vào bình đáy tròn của thiết bị cất quay (5.12).

Chú thích 1 - Chất lượng cột Florisil® thay đổi ở từng đợt. Phụ thuộc vào chất lượng này nên 50 ml hỗn hợp axeton - nước (4.12) có thể không đủ để rửa giải. Nếu trường hợp này xảy ra dùng 60 ml đến 70 ml hỗn hợp axeton - nước (4.12).

Cô đặc phần dung môi rửa giải trên thiết bị cất quay trong khoảng nhiệt độ 40°C - 50°C đến khi không còn axeton.

Chú thích 2 - Lúc này trong bình còn khoảng 0,5 ml chất lỏng. Các thực nghiệm đã cho thấy việc cho bay hơn thêm là không có hại và khi đó còn lại khoảng 0,5 ml chất lỏng, và lúc này không còn axeton. Các vết axeton có thể làm giảm aflatoxin B<sub>1</sub> trong cột C<sub>18</sub>.

Thêm 1 ml metanol (4.9), khuấy để hòa tan aflatoxin B<sub>1</sub> bám ở bình, thêm 4 ml nước và khuấy đều. Tháo và bỏ cột ra. Rửa cột thủy tinh bằng nước và những phần tử còn lại ở bước làm sạch cột C<sub>18</sub>.

## 8.4.2 Làm sạch bằng cột C<sub>18</sub>

### 8.4.2.1 Chuẩn bị dây cột

Gắn van ba chạc (5.9) vào phía cuối cột C<sub>18</sub> (4.7). Rửa cột và loại không khí bằng cách dùng si-ranh (5.10) bơm nhanh 10 ml metanol (4.9) vào cột. Có thể nhận thấy các bọt khí trong cột như những điểm sáng trong nền hơi xám. Lấy 10 ml nước và cho qua cột 8 ml nước. Tránh đưa không khí vào trong cột khi chuyển từ metanol sang nước.

Gắn vào phần dài hơn của cột thủy tinh (5.11) và cho nốt 2 ml nước còn lại qua cột. Khóa van. Bỏ si-ranh ra.

### 8.4.2.2 Làm sạch

Cho phần chiết được ở 8.4.1.2 vào cột thủy tinh (5.11), rửa bình hai lần bằng 5 ml hỗn hợp nước-metanol (4.15) và để chảy do tác dụng của trọng lực.

Trong quá trình này, đảm bảo rằng dây cột không bị khô. Nếu thấy xuất hiện bọt khí ở chỗ thắt, dùng dòng chảy và mở vòi ở đỉnh cột thủy tinh để loại bỏ bọt khí. Sau đó lại tiếp tục quá trình.

Rửa giải bằng 25 ml hỗn hợp nước - metanol (4.15). Lấy phần dung môi rửa giải ra. Rửa giải aflatoxin B<sub>1</sub> bằng 25 ml hỗn hợp nước - axeton (4.13) và thu phần dung môi rửa giải vào bình định mức dung tích 50 ml. Pha loãng đến vạch bằng nước và lắc đều. Dùng dung dịch này cho phần sắc ký (8.5).

Chú thích - Thông thường lọc phần dịch chiết cuối cùng trước khi đưa vào HPLC là không cần thiết. Nếu thấy cần xem xét không được lọc qua xenlulô vì sẽ làm giảm lượng aflatoxin B<sub>1</sub>. Nên dùng màng lọc PTFE.

## 8.5 Sắc ký lỏng hiệu năng cao

### 8.5.1 Khái quát

Phải có đủ thời gian để chuẩn bị và ổn định thiết bị.

Tốc độ dòng của pha động và chất thử sau cột đã được xác định. Chúng được điều chỉnh phụ thuộc vào đặc điểm của cột HPLC.

Kết quả phát hiện aflatoxin B<sub>1</sub> của detector phụ thuộc vào nhiệt độ, do vậy cần phải hiệu chỉnh sự chênh lệch này.

Bằng việc nạp một lượng dung dịch hiệu chuẩn xác định (4.26.3) tại những khoảng xác định (ví dụ ở mỗi lần nạp thứ ba) các giá trị của pic aflatoxin B<sub>1</sub> nên được hiệu chỉnh bằng cách lấy giá trị trung bình, để khẳng định sự khác nhau giữa các lần đo liên tiếp dung dịch hiệu chuẩn là rất nhỏ (< 10 %). Do vậy các lần nạp phải được tiến hành liên tục. Nếu cần có sự gián đoạn, lần nạp cuối cùng trước khi dừng và lần nạp đầu tiên sau khi dừng phải là dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3)

## **TCVN 6953 : 2001**

Do đường cong chuẩn là đường thẳng và đi qua gốc nên lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong mẫu chiết được xác định trực tiếp bằng cách so sánh kết quả thu được với dung dịch hiệu chuẩn gần kề.

### **8.5.2 Đặt chế độ nạp cho HPLC**

Đặt chế độ nạp (5.13.1) để có tốc độ dòng chảy của pha động (4.18) là 0,5 ml/phút hoặc 0,3 ml/phút với cột HPLC có kích thước hạt là 5 µm hoặc 3 µm tương ứng.

Nếu dùng dẫn xuất hoá bằng iốt, làm theo 8.5.3.

Nếu dùng dẫn xuất hoá bằng brom, làm theo 8.5.4.

### **8.5.3 Đặt chế độ nạp sau cột cho HPLC với dẫn xuất hoá bằng iốt**

Đặt chế độ bơm (5.14.1) để có tốc độ dòng của dung dịch iốt bão hòa (4.19) nằm trong khoảng 0,2 ml/phút đến 0,4 ml/phút. Nên đặt tốc độ dòng khoảng 0,4 ml/phút hoặc 0,2 ml/phút tương ứng với tốc độ dòng của pha động (4.18) là 0,5 ml/phút và 0,3 ml/phút.

### **8.5.4 Detector huỳnh quang**

Dùng detector huỳnh quang (5.13.3) với bước sóng kích thích là 365 nm và bước sóng truyền là 435 nm (đối với thiết bị lọc có bước sóng phát ra > 400 nm). Điều chỉnh bộ suy giảm của detector để phát hiện được khoảng 80 % đối với 1 ng aflatoxin B<sub>1</sub>.

### **8.5.5 Nạp**

Đối với mọi dung dịch, thể tích nạp là 250 µl theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### **8.5.6 Kiểm tra sự phân tách của sắc ký**

Nạp dung dịch thử sắc ký (4.27). Những phần lồi xuống phải nhỏ hơn 5 % tổng chiều cao các pic liền kề.

### **8.5.7 Kiểm tra tính ổn định của hệ thống**

Trước mỗi lần phân tích, nạp liên tục các dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3) đến khi thu được chiều cao pic ổn định. Các pic aflatoxin B<sub>1</sub> giữa các lần nạp liên tiếp không khác nhau quá 6%. Tiến hành kiểm tra ngay độ tuyến tính (8.5.8).

### **8.5.8 Kiểm tra độ tuyến tính**

Nạp các dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> (4.26.1 đến 4.26.4). Mỗi lần nạp thứ ba dùng dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3) để hiệu chỉnh sự chênh lệch kết quả. Các pic của dung dịch hiệu chuẩn không được khác nhau quá 10 % trong 90 phút. Hiệu chỉnh sự chênh lệch theo công thức ở 9.3.

Biểu đồ chuẩn là một đường thẳng và đi qua gốc tọa độ. Các giá trị thu được không khác nhau quá 3% các giá trị danh định.

Nếu các yêu cầu này được thỏa mãn tiến hành quá trình phân tích ngay. Và ngược lại nếu chưa thỏa mãn, phải xác định và hiệu chỉnh nguồn gốc của các nguyên nhân trước khi làm các bước tiếp theo.

### 8.5.9 Nạp mẫu chiết

Nạp liên tiếp dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3), dịch chiết thức ăn chăn nuôi không có aflatoxin B<sub>1</sub>, dịch chiết thức ăn chăn nuôi có aflatoxin B<sub>1</sub>, dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3), dịch chiết chất so sánh được công nhận hoặc mẫu kiểm tra (4.4) và dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3).

Nạp dịch chiết mẫu đã được làm sạch (8.4.2.2). Cứ sau khi nạp hai mẫu dịch chiết, nạp lại dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3). Khi đã nạp trên 10 mẫu, các lần nạp cuối cùng là các dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> (4.26.1 đến 4.26.4).

## 9 Tính toán kết quả

### 9.1 Tính lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub>

Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của dung dịch hiệu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> được tính theo công thức:

$$p = \frac{M \times A}{d \times k}$$

trong đó

p là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của dung dịch tiêu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> (4.24), tính bằng miligam trên mililit;

M là khối lượng phân tử gam của aflatoxin B<sub>1</sub>, (M = 312 g/mol), tính bằng gam trên mol;

A là độ hấp thụ đo ở 8.2, được hiệu chỉnh với mẫu trắng;

d là chiều dài đường quang của cuvet, (d = 1 cm), tính bằng centimét;

k là hệ số hấp thụ phân tử gam của aflatoxin B<sub>1</sub> trong clorofooc ở bước sóng 363 nm, l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (k = 22 300 l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

### 9.2 Tính lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch hiệu chuẩn được nạp vào

Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3) được nạp vào tính theo công thức:

$$m_c = f \times p \times V_{ic}$$

trong đó

$m_c$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3) được nạp vào, tính bằng nanogam;

$f$  là hệ số pha loãng và hiệu chỉnh đơn vị, ( $f = 200$  ng/mg) tính bằng nanogam trên miligam;

$p$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của dung dịch tiêu chuẩn aflatoxin B<sub>1</sub> (4.24), được tính trong 9.1, tính bằng nanogam trên mililit;

$V_{ic}$  là thể tích dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3) được nạp, ( $V_{ic} = 0,25$  ml), tính bằng mililit.

### **9.3 Tính hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch thử**

Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch thử được tính theo công thức:

$$m_a = \frac{A_s \times 2 m_c}{A_{c1} + A_{c2}}$$

trong đó

$m_a$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch thử, tính bằng nanogam;

$A_s$  là diện tích pic ứng với hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch thử, đơn vị diện tích;

$m_c$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3) được nạp, được tính theo 9.2, tính bằng nanogam;

$A_{c1}$  là diện tích pic ứng với hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> thu được trước khi nạp dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3), đơn vị diện tích;

$A_{c2}$  là diện tích pic ứng với hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> thu được sau khi nạp dung dịch hiệu chuẩn (4.26.3), đơn vị diện tích.

Chú thích - Có thể dùng chiều cao pic (tính theo đơn vị đo chiều dài) thay cho diện tích pic.

### **9.4 Tính hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong mẫu**

Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> có trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$w_a = \frac{M_a \times V_s \times V_c}{m_s \times V_{is} \times V_f}$$

trong đó

$w_a$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> có trong mẫu thử, tính bằng microgam trên kilogam;

$m_a$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong dung dịch thử, tính bằng nanogam;

$V_s$  là thể tích dịch chiết mẫu không pha loãng thu được ở 8.3 được dùng ở quá trình tiếp theo, ( $V_s = 50$  ml nếu không cần pha loãng dịch lọc thu được ở 8.3), tính bằng mililit;

$m_s$  là lượng mẫu thử, ( $m_s = 50,0$  g), tính bằng gam ;

$V_{is}$  là thể tích dịch chiết mẫu được nạp (8.5.8), ( $V_{is} = 0,25$  ml), tính bằng mililit;

$V_f$  là thể tích dịch lọc sử dụng cho làm sạch (8.4), ( $V_f = 50$  ml), tính bằng mililit;

$V_c$  là thể tích clorofooc sử dụng để chiết mẫu (xem 8.3), ( $V_c = 250$  ml), tính bằng mililit.

Nếu  $m_s = 50,0$  g,  $V_s = 50$  ml,  $V_{is} = 0,25$  ml,  $V_f = 50$  ml và  $V_c = 250$  ml công thức sẽ trở thành:

$$w_a = 20 \text{ g}^{-1} \times m_a$$

## 10 Độ chụm

### 10.1 Sai số hệ thống

Thẩm định việc áp dụng đúng phương pháp bằng cách tiến hành lặp lại các phép đo trên những chất chuẩn đã được chứng nhận hoặc trên các mẫu kiểm tra. Nếu chúng không phù hợp, thẩm tra phương pháp bằng những thực nghiệm trên các mẫu trắng bổ sung. Độ lệch trung bình so với giá trị thực tế được biểu diễn bằng phần trăm của giá trị thực không được nằm ngoài khoảng (- 20% đến + 10%).

### 10.2 Độ chụm

#### 10.2.1 Thử nghiệm liên phòng thí nghiệm

Thông tin chi tiết các thử nghiệm liên phòng thí nghiệm về độ chụm của phương pháp được tóm tắt trong phụ lục A. Các giá trị này không áp dụng với những dải nồng độ hoặc thành phần với những dải nồng độ hoặc thành phần đã cho.

Phụ lục B tóm tắt các kết quả thống kê của thử nghiệm liên phòng thí nghiệm về đương lượng của dẫn xuất hoá iốt và brom.

#### 10.2.2 Độ lặp lại

Sự chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn độc lặp do cùng một kiểm nghiệm viên thực hiện trên cùng một phương pháp đối với cùng mẫu kiểm tra trên cùng một thiết bị và trong cùng một phòng thí nghiệm sẽ không có trên 5% trường hợp vượt giới hạn lặp lại ( $r$ ) được tính theo công thức:

$$r = 0,37 \mu\text{g/kg} + 0,19 \overline{w_a} \quad (w_a \leq 15 \mu\text{g/kg})$$

trong đó

$\overline{w_a}$  là giá trị trung bình của hai kết quả,  $\mu\text{g/kg}$ ;

$r$  là giới hạn lặp lại,  $\mu\text{g/kg}$ .

**10.2.3 Độ tái lập**

Sự chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm của các kiểm nghiệm viên khi áp dụng cùng một phương pháp đối với mẫu kiểm tra trên thiết bị khác nhau và ở các phòng thí nghiệm khác nhau sẽ không có trên 5% trường hợp vượt giới hạn lặp lại (R) được tính theo công thức sau:

$$R = 0,67 \mu\text{g/kg} + 0,33 \overline{w_a} \quad (w_a \leq 15 \mu\text{g/kg})$$

trong đó

$\overline{R}$  là giới hạn tái lập,  $\mu\text{g/kg}$ ;

$w_a$  là giá trị trung bình của hai kết quả,  $\mu\text{g/kg}$ .

**11 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải thể hiện:

- tất cả những thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- phương pháp lấy mẫu, nếu biết;
- phương pháp thử đã áp dụng, viện dẫn theo tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết tiến hành không qui định trong tiêu chuẩn hoặc được phép lựa chọn cùng với các chi tiết của bất kỳ yếu tố nào có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- hoặc nếu đã kiểm tra độ lặp lại, ghi cả kết quả cuối cùng.

**Phụ lục A**

(tham khảo)

**Kết quả thử nghiệm liên phòng thí nghiệm**

Độ chụm của phương pháp được xây dựng trên kết quả thử nghiệm liên phòng thí nghiệm tiến hành theo TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994) [6]. Có 22 phòng thí nghiệm từ 11 quốc gia thành viên EU tham gia thử nghiệm. Nghiên cứu trên 6 mẫu không biết trước, gồm cả những mẫu thức ăn chăn nuôi có hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> < 2 µg /kg, 8 µg /kg và 14 µg /kg.

**Bảng A.1 - Kết quả thống kê thử nghiệm liên phòng thí nghiệm áp dụng phương pháp dẫn xuất iốt**

Thông số	Mẫu <sup>a)</sup>		
	1	2	3
Số phòng thí nghiệm được chọn *)	15	15	15
Hàm lượng aflatoxin B <sub>1</sub> trung bình, g/kg	0,8	7,0	12,6
Độ lệch chuẩn lặp lại (s <sub>r</sub> ), µg/kg	0,20	0,44	1,20
Hệ số biến động lặp lại, %	25,0	6,3	9,5
Giới hạn lặp lại (r) [r = 2,8 x s <sub>r</sub> ], µg/kg	0,55	1,24	3,37
Độ lệch chuẩn tái lập (s <sub>R</sub> ), µg/kg	0,34	1,02	1,80
Hệ số biến động tái lập, %	42,5	14,6	14,3
Giới hạn tái lập (R) [R = 2,8 x s <sub>R</sub> ], µg/kg	0,95	2,86	5,05

a) Mẫu 1: Mẫu trắng; hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> < 2 µg/kg; gồm: 10 % đại mạch, 20 % sắn, 15 % bã cam, 20 % đậu tương có protein cao, 10 % mật rỉ đường, 20 % thức ăn gia súc viên cho bò, 1,7 % chất béo, 1,5 % dicanxi photphat và 0,7 % muối.  
Mẫu 2: Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> = 8 µg/kg, các thành phần khác giống mẫu 1.  
Mẫu 3: Hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> = 14 µg/kg, các thành phần khác giống mẫu 1.  
\*) Số phòng thí nghiệm được chọn không tính phòng thí nghiệm đã bị loại.

Chú thích - Trong báo cáo kết quả của các phòng thí nghiệm (xem tham khảo 3), các giá trị r và R (xem bảng A.2) được rút ra từ bảng A.1. Sự sai khác là các kết quả tính toán có được bằng cách lấy logarit những kết quả đo và việc áp dụng các định nghĩa độ lệch chuẩn r và R. Trong bảng A.2, r là tỷ số giữa hai kết quả lớn nhất của cùng một mẫu được tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm và ở cùng một điều kiện. R được định nghĩa tương tự trong việc so sánh sự khác nhau giữa hai phòng thí nghiệm.

**Bảng A.2 - Tóm tắt kết quả thống kê thử nghiệm liên phòng thí nghiệm đã công bố**

Hàm lượng aflatoxin B <sub>1</sub> (µg/kg)	r (µg/kg)	R (µg/kg)	Hệ số biến động lặp lại (%)	Hệ số biến động tái lập (%)
8 và 14	1,4	1,7	11	18

## Phụ lục B

(tham khảo)

## Đương lượng dẫn xuất hoá iốt và dẫn xuất hoá brom

Đương lượng dẫn xuất hoá iốt và dẫn xuất hoá brom có thể suy luận từ số liệu công bố (xem tham khảo 3 và 4). Hơn nữa đương lượng được thấy rõ qua các số liệu do KDLL tập hợp (Kwaliteitsdienst Landbouwkundige Laboratoria: Ban Chất lượng Phòng thí nghiệm Nông nghiệp, Hà lan) trong giai đoạn từ tháng 10/1992 đến tháng 7/1994. Trong giai đoạn này các phòng thí nghiệm đều tiến hành theo hai phương pháp dẫn xuất trên các mẫu có thành phần khác nhau và các thức ăn chăn nuôi có hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trong khoảng từ 2 µg/kg đến 90 µg/kg. Các kết quả thử nghiệm này nằm trong bảng B.1.

**Bảng B.1 - Kết quả thống kê các thí nghiệm về sự đương lượng giữa dẫn xuất hoá iốt và dẫn xuất hoá brom**

Mẫu	Dẫn xuất hoá iốt <sup>a</sup>			Dẫn xuất hoá brom <sup>a</sup>			Mức ý nghĩa <sup>b</sup>
	$\bar{w}_a$	n	s	$\bar{w}_a$	n	s	
Thức ăn cho bò (dạng viên)	2,1	4	0,4	2,1	8	0,3	n.s
	2,2	4	0,3	2,2	8	0,3	n.s
	2,2	6	0,5	1,9	11	0,3	n.s
	2,3	6	0,5	2,0	11	0,4	n.s
	4,5	3	0,2	4,8	8	0,4	n.s
	4,7	3	0,2	4,7	8	0,5	n.s
	5,0	6	0,8	5,4	11	0,9	n.s
	5,1	6	0,7	5,4	11	0,8	n.s
	8,3	5	1,6	9,0	10	1,0	n.s
	9,6	5	1,1	10,1	10	1,7	n.s
	10,8	6	1,6	9,5	9	1,6	n.s
12,1	6	1,4	11,8	9	1,8	n.s	
Gluten ngô	16,3	6	2,3	16,4	11	2,0	n.s
	17,6	6	2,4	18,9	11	1,5	n.s
Cùi dừa khô	19,7	6	4,4	17,7	8	2,7	n.s
	20,2	6	3,1	18,6	8	2,3	n.s
	27,9	4	3,4	29,3	8	1,6	n.s
	29,0	4	3,1	33,2	8	1,7	p < - 0,01
Nhân hạt cọ dầu và lạc	38,1	6	7,4	35,3	11	5,3	n.s
	53,7	6	10,7	48,7	11	7,3	n.s
Lạc	82,0	4	4,1	84,4	7	7,1	n.s
	83,0	4	9,9	86,0	7	10,7	n.s
Lạc và cơm dừa khô	80,0	4	5,5	86,1	9	7,3	n.s
	85,5	4	9,2	94,1	9	9,3	n.s

a)  $w_a$  là hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> trung bình, µg/kg;

n là số kết quả;

s là độ lệch chuẩn.

b) n.s là không có ý nghĩa thống kê theo Student's t-test, iốt được thử nghiệm dựa theo brom.

## Tài liệu tham khảo

1. Traag W.A., van Trijp J.M.P., Tuinstra L.G.M.Th. và Kok W.Th, Làm sạch mẫu và dẫn xuất sau cột để xác định aflatoxin B<sub>1</sub> trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng. *J. Chrom.*, **396**, pp. 389-394 (1987).
  2. RIKILT-DLO, SOP A0446, Viện Kiểm tra các Sản phẩm Nông nghiệp Quốc gia, Ban Nghiên cứu Nông nghiệp (DLO), Grondstoffen voor veevoeder. *Xác định trực tiếp aflatoxin B<sub>1</sub> - Sắc ký lỏng phân giải cao - Dẫn xuất sau cột - Phát hiện bằng detector huỳnh quang (Xác định trực tiếp aflatoxin B<sub>1</sub> trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng phân giải cao và dùng detector huỳnh quang)*.
  3. Van Egmond H.P., Heisterkamp S.H và Paulsch W.E. EC-Cộng tác nghiên cứu xác định aflatoxin B<sub>1</sub> trong thức ăn chăn nuôi. *Phụ gia thực phẩm và các Chất nhiễm bẩn*, **8**, pp.17-29 (1991).
  4. Van Egmond H.P., Patel S., Paulsch W.E., Sizoo E.A. Tuinstra L.G.M.Th., Wood G., Boenke A., Schurer B, và Wagstaffe P.J. Xây dựng 5 nguyên liệu tham khảo dùng làm thức ăn chăn nuôi, xác định trước hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> của chúng. *Phụ gia thực phẩm và các Chất nhiễm bẩn*, **11**, pp.449-477 (1994).
  5. TCVN 6910-1 : 2001 (ISO 5725-1 : 1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo.*  
*Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
  6. TCVN 6910-2 : 2001 (ISO 5725-2 : 1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo.*  
*Phần 2: Phương pháp cơ bản để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
  7. ISO 6497 *Thức ăn chăn nuôi Lấy mẫu (Ani mal feeding stuffs - Sam pling)*.
  8. TCVN 6599 : 2000 (ISO 6651) *Thức ăn chăn nuôi Xác định hàm lượng aflatoxin B<sub>1</sub> (Phương pháp TLC)*.
-