

## Lời nói đầu

TCVN 7595-2:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 15141-2:1998;

TCVN 7595-2:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13  
*Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu  
chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ  
công bố. *High performance liquid chromatographic method with bic*

# Thực phẩm – Xác định ocratoxin A trong ngũ cốc và sản phẩm ngũ cốc – Phần 2: Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao làm sạch bằng bicacbonat

*Foodstuffs – Determination of ochratoxin A in cereals and cereal products – Part 2: High performance liquid chromatographic method with bicarbonate clean up*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định ocratoxin A (OTA) với các hàm lượng lớn hơn 3 µg/kg.

Phương pháp này đã được xác nhận thành công trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm theo ISO 5725:1986 [1], thực hiện trên hạt lúa mạch có chứa 2,9 µg/kg, 3,0 µg/kg, 7,4 µg/kg và 14,4 µg/kg ocratoxin A, trên ngô hạt có chứa 8,2 µg/kg và 16,3 µg/kg ocratoxin A cũng như thử nghiệm trên cám lúa mì có chứa 3,8 µg/kg và 4,5 µg/kg ocratoxin A.

**CHÚ THÍCH** Kinh nghiệm của nhiều phòng thử nghiệm cho thấy rằng phương pháp này cũng có thể áp dụng cho bột mì.

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành, thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 4851-89 (ISO 3696:1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

## 3 Nguyên tắc

Ocratoxin A (OTA) được chiết ra khỏi ngũ cốc bằng axit phosphoric loãng trong clorofoc và được tách phân đoạn bằng dung dịch bicacbonat loãng. Dung dịch này dùng cho cột C<sub>18</sub> và ocratoxin A được rửa

giải bằng axit etyl axetic-metanol-axetat. Ocratoxin A được tách bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo, rồi được nhận biết và định lượng bằng huỳnh quang. Chạy sắc ký dẫn xuất của este metyl ocratoxin A để khẳng định việc nhận dạng [2] đến [5].

**CẢNH BÁO** Ocratoxin A gây độc đến gan và thận và nó là một chất có thể gây ung thư. Phải tuân thủ các yêu cầu phòng ngừa về an toàn thích hợp [6] khi xử lý các hợp chất như thế và đặc biệt là tránh xử lý chúng dưới dạng khô vì bản chất tĩnh điện học có thể dẫn đến sự phân tán và hít phải. Có thể khử nhiễm các dụng cụ bằng dung dịch natri hypoclorit 4 %. Cần chú ý tới lời cảnh báo của Tổ chức Quốc tế Nghiên cứu về bệnh ung thư (Tổ chức Y tế Thế giới) [7], [8].

## 4 Thuốc thử

Trong suốt quá trình phân tích, chỉ sử dụng thuốc thử được công nhận đạt chất lượng tinh khiết phân tích và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước loại 1 của TCVN 4851 – 89 (ISO 3696 : 1987), trừ khi có qui định khác. Dung môi phải đạt chất lượng để dùng cho phân tích HPLC.

**4.1 Clorofom**, được ổn định, ví dụ với 2-metyl-2-buten hoặc etanol.

**4.2 Axit phosphoric**,  $c(\text{H}_3\text{PO}_4) \approx 0,1 \text{ mol/l}$ .

**4.3 Diatomit**

Ngâm khoảng 900 g diatomit đã làm sạch bằng axit, ví dụ Celite® 545<sup>1)</sup>, trong metanol (4.7) để qua đêm. Lọc qua giấy lọc hai lớp cho qua phễu Buchner (5.6), rửa bằng 8 lít nước và để khô trong 12 giờ ở 150 °C.

**4.4 Dung dịch natri bicacbonat**,  $\rho(\text{NaHCO}_3) = 30 \text{ g/l}$ .

**4.5 Etyl axetat**.

**4.6 Toluen**.

**4.7 Metanol**.

**4.8 Axit axetic băng**,  $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) \approx 98 \%$

**4.9 Axetonitril**.

**4.10 Diclorometan**.

<sup>1)</sup> Celite® 545 là một ví dụ về sản phẩm sẵn có trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng Tiêu chuẩn này và tổ chức CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

**4.11 Dung dịch rửa giải:** etyl axetat (4.5), metanol (4.7) và axit axetic băng (4.8) với các phần tương ứng là 95+5+0,5 (V+V+V).

**4.12 Pha động:** trộn axetonitril (4.9), nước và axit axetic băng (4.8) với các phần tương ứng là 99+99+2 (V+V+V) và khử khí.

**4.13 Hỗn hợp dung môi:** toluen (4.6) và axit axetic băng (4.8) với các phần tương ứng là 99+1 (V+V).

**4.14 Bo triflorua.**

**4.15 Bo triflorua trong dung dịch metanol,**  $\rho(\text{BF}_3) = 14 \text{ g}/100 \text{ ml}$

**CẢNH BÁO** Sử dụng tủ hút khói tốt. Tránh để tiếp xúc với da, mắt và đường hô hấp.

**4.16 Ocratoxin A,** dạng tinh thể hoặc dạng viên nang.

**4.17 Dung dịch gốc ocratoxin A**

Hoà tan 1 mg dung dịch ocratoxin A (dạng tinh thể) (4.16) hoặc lượng chứa trong 1 viên nang (nếu ocratoxin A dưới dạng màng mỏng) trong hỗn hợp dung môi (4.13) để thu được dung dịch chứa khoảng 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  đến 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ocratoxin A.

Để xác định chính xác nồng độ, ghi lại đường hấp thụ giữa bước sóng cách nhau 5 nm trong dải từ 300 nm đến 370 nm trong cuvet thạch anh 1 cm (5.4) với hỗn hợp dung môi làm đối chứng. Xác định bước sóng của độ hấp thụ cực đại bằng cách ghi lại ở các bước sóng cách nhau 1 nm quanh giá trị cực đại làm đối chứng. Tính nồng độ khối lượng của ocratoxin A,  $\rho_{OTA}$ , bằng microgam trên mililit theo công thức (1):

$$\rho_{OTA} = A_{max} \times \frac{M \times 100}{\kappa \times \delta} \quad (1)$$

trong đó

$A_{max}$  là độ hấp thụ xác định được ở giá trị cực đại của đường hấp thụ (ở đây là 300 nm);

$M$  là khối lượng phân tử tương đối của ocratoxin A ( $M = 403 \text{ g}/\text{mol}$ );

$\kappa$  là hệ số hấp thụ phân tử tương đối của ocratoxin A trong hỗn hợp dung môi (ở đây là 544  $\text{m}^2/\text{mol}$ );

$\delta$  là độ dài quang của cuvet, tính bằng centimet;

**4.18 Dung dịch chuẩn ocratoxin A**

Pha loãng dung dịch gốc (4.17) với hỗn hợp dung môi (4.13) để được dung dịch chuẩn có nồng độ khối lượng của ocratoxin A là 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Dung dịch này có thể bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C. Cần kiểm tra sự ổn định.

#### 4.19 Dung dịch hiệu chuẩn ocratoxin A

Dùng xyranh có dung tích đã định (5.16) lấy 5 µl, 10 µl, 25 µl, 50 µl và 100 µl dung dịch chuẩn (4.18) cho vào các lọ nhỏ riêng biệt 4 ml đến 5 ml (5.15). Cho bay hơi đến vừa khô dưới dòng nitơ. Thêm 1,0 ml pha động (4.12) vào mỗi lọ nhỏ để có được các nồng độ khối lượng ocratoxin A cuối cùng là 0,5 ng/25 µl, 1 ng/25 µl, 2,5 ng/25 µl, 5 ng/25 µl và 10 ng/25 µl.

#### 4.20 Dung dịch natri hypoclorit, $\rho(\text{NaOCl}) = 4 \text{ g}/100 \text{ ml}$

### 5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy nghiền phòng thử nghiệm và sàng thử nghiệm có cỡ lỗ 1 mm.

5.2 Máy trộn tốc độ cao, bình 1250 ml có nắp đậy.

5.3 Máy đo phổ, có thể đo ở bước sóng từ 300 nm đến 370 nm, chiều rộng đường phổ không quá  $\pm 2 \text{ nm}$ .

5.4 Cuvet thạch anh, có chiều dài đường quang 1 cm và hấp thụ không đáng kể ở bước sóng từ 300 nm đến 370 nm.

5.5 Bộ lọc sợi thủy tinh, dày 0,3 mm, cỡ lỗ 1,5 µm, đường kính 9,0 cm (hoặc tương đương).

5.6 Phễu Buncher, có các đường kính thích hợp, ví dụ: 9 cm và 25 cm.

5.7 Giấy lọc gấp nếp.

5.8 Phễu chiết, 25 ml và 100 ml.

5.9 Máy ly tâm, có ống hoặc bình 100 ml.

5.10 Ống hấp phụ, ống polypropylen 3 ml dùng một lần, có chứa 500 mg silica  $\text{C}_{18}$  40 µm.

5.11 Bộ hút chân không nhiều cổng, mỗi cổng có một khóa vòi để giữ cột  $\text{C}_{18}$ . Có thể được thay bằng xyranh (5 ml đến 10 ml) với ống nối thích hợp.

5.12 Ống nghiệm, ví dụ: 10 ml làm bằng polytetrafluoroetylen (PTFE) đậy bằng nắp vặn.

5.13 Bộ lọc màng, có cỡ lỗ khoảng 0,45 µm.

**5.14 Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), gồm có:**

**5.14.1 Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao,** bình chứa dung môi, bơm mẫu có thể điều chỉnh tốc độ dòng từ 0,5 ml/phút đến 5 ml/phút, van tiêm ví dụ: có vòng 25  $\mu$ l, detector huỳnh quang, máy ghi hoặc bộ tích phân.

**5.14.2 Cột phân tích HPLC pha đảo,** ví dụ: Supelco<sup>2)</sup>

- chiều dài: 250 mm
- đường kính trong: 4,6 mm
- hạt nhồi: C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m hoặc tương đương

**CHÚ THÍCH** Có thể sử dụng cột ngắn hơn (ví dụ cột có chiều dài 120 mm đến 150 mm).

**5.15 Lọ,** khoảng 5 ml có nắp vận PTFE, hoặc bình chứa có nắp hàn kín thích hợp.

**5.16 Xanh thể tích xác định.**

## 6 Cách tiến hành

### 6.1 Khái quát

Toàn bộ qui trình phân tích cần được thực hiện trong ngày. Nếu cùng một lúc chuẩn bị vài mẫu thì tất cả các mẫu cần được phân tích cùng một thời điểm trong suốt cả đêm bằng cách sử dụng bộ bơm mẫu tự động.

### 6.2 Chuẩn bị mẫu thử

Dùng máy nghiền phòng thử nghiệm (5.1) để nghiền mẫu thử và trộn kỹ cho đến khi lọt hết qua sàng 1 mm (5.1) hoặc dùng máy trộn để trộn kỹ.

### 6.3 Chiết ocratoxin A ra khỏi mẫu

Cân 50 g mẫu thử đã chuẩn bị theo 6.2, chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn (5.2) và trước tiên cho thêm 250 ml cloroform (4.1) sau đó thêm 25 ml axit phosphoric (4.2). Trộn trong 3 phút với tốc độ trung bình. Gần cuối giai đoạn trộn cho thêm 10 g (45 ml) diatomit (4.3). Lọc dịch chiết qua bộ lọc sợi thủy tinh (5.5) đã được phủ một lượng khoảng 10 g diatomit lên trên phễu Buchner 9 cm (5.6), hoặc lọc qua giấy lọc gấp nếp 32 cm (5.7). Thu lấy ít nhất 50 ml dịch lọc.

### 6.4 Tách

<sup>2)</sup> Supelco là một ví dụ về sản phẩm có sẵn trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng Tiêu chuẩn này và tổ chức CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Chuyển 50 ml dịch lọc sang phễu chiết 100 ml (5.8). Cho thêm 10 ml dung dịch natri bicacbonat (4.4) và lắc nhẹ. Để yên tách pha. Nếu hình thành nhũ tương, thì ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 2000 vòng /phút. Thu lấy pha lỏng phía trên để chiết cột.

### 6.5 Chuẩn bị cột

Gắn cột (5.10) vào bộ hút chân không nhiều cổng (5.11) với bình nón 25 ml hoặc cốc bên trong bộ hút chân không để thu lấy các dung môi rửa và ổn định. Rửa mỗi cột 2 lần bằng 2 ml metanol (4.7), 2 ml nước và 2 ml dung dịch natri bicacbonat (4.4). **KHÔNG ĐỂ CỘT CHẢY ĐẾN KHÔ**. Hút nhẹ để tăng tốc độ rửa giải. Qui trình này cũng có thể thực hiện bằng tay bằng cách tạo áp lực bởi xyranh 5 ml đến 10 ml được đặt cố định trên đỉnh cột. Để lại khoảng 2 mm dung môi trên đỉnh cột (frít).

### 6.6 Chiết cột

Dùng pipet lấy 5 ml dịch chiết bicacbonat thu được trong 6.4 cho vào cột C<sub>18</sub>. **KHÔNG ĐỂ CỘT CHẢY ĐẾN KHÔ**. Rửa bằng 2 ml dung dịch axit phosphoric (4.2) sau đó bằng 2 ml nước. Loại bỏ nước rửa.

Rửa giải ocratoxin A bằng 8 ml dung dịch rửa giải (4.11). Thu lấy dịch rửa giải vào ống nghiệm 10 ml (5.12) có chứa 2 ml nước. Lắc hoặc khuấy dịch rửa giải bằng đũa thủy tinh để trộn hai pha với nhau. Dùng pipet lấy dịch rửa đã chiết ocratoxin A (pha trên) cho vào một ống nghiệm 10 ml khác có nắp vặn (5.12). Tráng pha phía trên còn lại ra khỏi ống thứ nhất hai lần bằng 1 ml etyl axetat (4.5) và cho vào pha ocratoxin A trong ống thứ hai. Cho bay hơi đến vừa khô dưới dòng nitơ. Hoà tan ngay vào 500 µl (V<sub>T</sub>) của pha động (4.12) và lọc qua bộ lọc 0,45 µm (5.13) cho vào lọ nhỏ có nắp vặn 5 ml (= dung dịch mẫu thử).

Giữ dung dịch mẫu thử còn lại để khẳng định nhận biết qua sự hình thành metyl este (xem 6.11)

### 6.7 Các điều kiện vận hành HPLC

Khi sử dụng cột theo 5.14.2 và pha động theo 4.12 thì cài đặt như sau là thích hợp:

Tốc độ dòng:	1 ml/phút
Phát hiện huỳnh quang [có cách tử (grating)]:	Bước sóng kích thích: 333 nm Bước sóng phát xạ: 460 nm
Phát hiện huỳnh quang (có bộ lọc):	420 nm
Thể tích bơm (V <sub>i</sub> )	20 µl đến 25 µl và sử dụng ít nhất 50 µl để làm đầy vòng 25 µl

## 6.8 Đường chuẩn

Chuẩn bị đường chuẩn ngay từ khi bắt đầu phân tích và bất cứ khi nào thay đổi các điều kiện.

Bơm ít nhất bốn dung dịch hiệu chuẩn có các nồng độ thích hợp khác nhau (xem 4.19).

Vẽ đồ thị các giá trị huỳnh quang của các dung dịch hiệu chuẩn ocratoxin A dựa theo các nồng độ khối lượng ocratoxin A, tính bằng nanogam.

Cần kiểm tra độ tuyến tính [9].

## 6.9 Nhận biết

Nhận biết ocratoxin A bằng cách so sánh thời gian lưu của mẫu với thời gian lưu của chất chuẩn.

Đôi khi có thể cần phải nhận biết pic của ocratoxin A bằng cách bơm đồng thời dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn.

## 6.10 Xác định

Chạy đo sắc ký ngay đối với mẫu thử. Tiến hành xác định bằng phương pháp ngoại chuẩn, tích phân diện tích pic hoặc xác định chiều cao pic và so sánh các kết quả thu được với các giá trị của chất chuẩn với diện tích pic/chiều cao pic gần nhất, hoặc sử dụng đường chuẩn. Trong trường hợp đường chuẩn thì các dung dịch bổ sung có các nồng độ nằm trong dải tuyến tính có thể được chuẩn bị cho đường chuẩn.

Bơm các thể tích bằng nhau của dung dịch mẫu thử và dung dịch chuẩn dùng cho đường chuẩn.

Đọc khối lượng ocratoxin A, tính bằng nanogam, tương ứng với huỳnh quang của dung dịch mẫu thử từ đường chuẩn.

Nếu hàm lượng ocratoxin A của mẫu nằm ngoài đường chuẩn, thì điều chỉnh lượng mẫu bơm bằng cách cô đặc hoặc pha loãng dung dịch mẫu thử.

## 6.11 Khẳng định

Nếu cần khẳng định việc nhận biết, thì bằng cách làm biến mất pic tại thời gian lưu đối với ocratoxin A và cho xuất hiện lại pic mới tại cùng thời gian lưu như thời gian lưu của este metyl chuẩn của ocratoxin A (sau khoảng 15 phút).

Chuyển lượng dung dịch mẫu thử còn lại (xem 6.6) vào phễu chiết 25 ml (5.8), tráng ba lần, mỗi lần 1 ml diclorometan (4.10) để tráng lọ. Lắc và để yên cho tách lớp. Thu lấy lớp phía dưới cho vào lọ nhỏ (5.15) và để cho bay hơi đến khô.



Chuyển 100 µl dịch ocratoxin A chuẩn (4.18) vào lọ nhỏ khác (5.15) và cho bay hơi đến khô.

Cho 0,5 ml dung dịch bo triflorua metanol (4.15) vào mỗi lọ nhỏ, đậy nắp và làm nóng 15 phút trên nồi cách thủy ở 50°C đến 60°C. Cho bay hơi đến khô trên nồi hơi dưới dòng khí nitơ.

Nếu có mặt của nước thì thêm 1 ml axetonitril (4.9) và tiếp tục cho bay hơi đến khô. Làm nguội và pha loãng bằng pha động (4.12) đến cùng thể tích giống như dùng cho phân tích HPLC của dung dịch mẫu thử chưa dẫn xuất (xem 6.7.3) và dung dịch này được dùng để tách sắc ký trong các điều kiện như mô tả trong 6.7.

Việc kết thúc dẫn xuất có thể được kiểm tra bằng sắc phổ.

## 7 Tính toán

Tính phần khối lượng  $w_{OTA}$  của ocratoxin A bằng microgam trên kilogam, sử dụng công thức (2) (phương pháp ngoại chuẩn):

$$w_{OTA} = \frac{R_s \times V_T}{R_A \times V_I \times m} \quad (2)$$

trong đó

$m$  là số đo của phần mẫu thử trong dịch chiết cuối cùng, ở đây:  $50 \text{ g} \times 50 \text{ ml} \times 5 \text{ ml} / 250 \text{ ml} \times 10 \text{ ml} = 5 \text{ g}$ ;

$R_s$  là số đo của dung dịch mẫu thử đã tiêm được đo theo diện tích pic hoặc chiều cao pic.

$R_A$  là số đo (số đo đối với 1 ng ocratoxin A) chuẩn hoá trung bình tính được của năm dung dịch hiệu chuẩn khác nhau;

$V_T$  là thể tích cuối cùng của dung dịch mẫu thử (trong trường hợp này là 500 µl);

$V_I$  là thể tích của mẫu thử đã bơm (trong trường hợp này là 25 µl).

Ghi lại kết quả theo qui định hiện hành và sau khi làm tròn đến hai chữ số thập phân.

Nêu rõ việc thực hiện chỉnh sửa hay không chỉnh sửa hệ số thu hồi.

## 8 Độ chụm

### 8.1 Yêu cầu chung

Các chi tiết về phép thử liên phòng thí nghiệm về độ chụm của phương pháp theo ISO 5725:1986 [1] được đưa ra trong phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ của mẫu cần phân tích và các chất nền khác với phụ lục A.

## 8.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thực hiện trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn nhất có thể, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại  $r$ .

Các giá trị này là:

Lúa mạch:	$\bar{X} = 7,4 \mu\text{g/kg}$	$r = - \mu\text{g/kg}$
Lúa mạch:	$\bar{X} = 14,4 \mu\text{g/kg}$	$r = 3,1 \mu\text{g/kg}$
Ngô:	$\bar{X} = 8,2 \mu\text{g/kg}$	$r = - \mu\text{g/kg}$
Ngô:	$\bar{X} = 16,3 \mu\text{g/kg}$	$r = 9,2 \mu\text{g/kg}$
Lúa mạch:	$\bar{X} = 3,0 \mu\text{g/kg}$	$r = 1,28 \mu\text{g/kg}$
Lúa mạch:	$\bar{X} = 2,9 \mu\text{g/kg}$	$r = 1,37 \mu\text{g/kg}$
Cám lúa mì:	$\bar{X} = 4,5 \mu\text{g/kg}$	$r = 2,16 \mu\text{g/kg}$
Cám lúa mì:	$\bar{X} = 3,8 \mu\text{g/kg}$	$r = 2,23 \mu\text{g/kg}$

## 8.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thực hiện trên vật liệu thử giống hệt nhau, do hai phòng thử nghiệm thực hiện không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập  $R$ .

Các giá trị đó là:

Lúa mạch:	$\bar{X} = 7,4 \mu\text{g/kg}$	$R = 5,6 \mu\text{g/kg}$
Lúa mạch:	$\bar{X} = 14,4 \mu\text{g/kg}$	$R = 10,6 \mu\text{g/kg}$
Ngô:	$\bar{X} = 8,2 \mu\text{g/kg}$	$R = 4,8 \mu\text{g/kg}$
Ngô:	$\bar{X} = 16,3 \mu\text{g/kg}$	$R = 12,9 \mu\text{g/kg}$
Lúa mạch:	$\bar{X} = 3,0 \mu\text{g/kg}$	$R = 1,9 \mu\text{g/kg}$
Lúa mạch:	$\bar{X} = 2,9 \mu\text{g/kg}$	$R = 1,74 \mu\text{g/kg}$
Cám lúa mì:	$\bar{X} = 4,5 \mu\text{g/kg}$	$R = 3,35 \mu\text{g/kg}$
Cám lúa mì:	$\bar{X} = 3,8 \mu\text{g/kg}$	$R = 2,58 \mu\text{g/kg}$

## 9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp đã sử dụng;
- kết quả và đơn vị biểu thị kết quả;
- ngày tháng lấy mẫu và kiểu loại lấy mẫu (nếu có);
- ngày tháng nhận mẫu thử nghiệm;
- ngày tháng thử nghiệm;
- các điểm quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc các phương án lựa chọn mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

## Phụ lục A

(tham khảo)

### Các dữ liệu về độ chụm

Theo ISO 5725:1986 [1], các thông số sau đây thu được trong một phép thử liên phòng thí nghiệm. Phép thử này được AOAC quốc tế thực hiện trong Cupertino cùng với IUPAC và Ủy ban Nordic về phân tích thực phẩm (NMKL). Tổng số có 16 phòng thử nghiệm của Châu Âu, Canada và United State tham gia thử nghiệm trên lúa mạch và ngô đã bổ sung tương ứng 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  và 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ocratoxin A [4], [5]. Các kết quả của nghiên cứu này được đưa ra trong Bảng A.1.

Bảng A.1

Mẫu	Lúa mạch	Lúa mạch	Ngô	Ngô
Năm tiến hành thử liên phòng thí nghiệm	1990	1990	1990	1990
Số lượng phòng thử nghiệm	16	16	16	16
Số lượng mẫu	1	2	1	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	15	14	15	15
Số lượng ngoại lệ	1	2	1	1
Số lượng kết quả được chấp nhận	15	28	15	30
Giá trị trung bình $\bar{X}$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	7,4	14,4	8,2	16,3
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	-	1,1	-	3,3
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r$ , %	-	7,9	-	20,1
Giới hạn lặp lại $r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	-	3,1	-	9,2
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2,0	3,8	1,7	4,6
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R$ , %	27,2	26,5	20,7	28,4
Giới hạn tái lập $R$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	5,6	10,6	4,8	12,9
Độ thu hồi, %	74	72	82	82

Trong nghiên cứu liên phòng thí nghiệm thứ hai, 12 phòng thử nghiệm trong khối Châu Âu đã phân tích các mẫu cám lúa mì và lúa mạch đen đã bổ sung ocratoxin A và các mẫu lúa mạch bị nhiễm bản tự

nhiên. Các nồng độ ocratoxin A từ 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  đến 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [4], [5]. Các kết quả của nghiên cứu này được đưa ra trong bảng A.2.

**Bảng A.2**

Mẫu	Lúa mạch	Lúa mạch	Lúa mạch đen	Lúa mạch đen	Cám lúa mì	Cám lúa mì
Năm tiến hành thử liên phòng thí nghiệm	1993	1993	1993	1993	1993	1993
Số lượng phòng thử nghiệm	16	16	16	16	16	16
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	12	12	12	12
Số lượng ngoại lệ	4	4	4	4	4	4
Số lượng kết quả được chấp nhận	24	24	24	24	24	24
Giá trị trung bình $\bar{X}$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	3,0	2,9	4,8	2,9	4,5	3,8
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0,46	0,49	0,78	0,64	0,77	0,80
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r$ , %	15,2	17,1	16,2	22,5	17,1	20,8
Giới hạn lặp lại $r$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1,28	1,37	2,18	1,80	2,16	2,23
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0,68	0,62	1,11	0,84	1,20	0,92
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập $RSD_R$ , %	22,6	21,7	23,0	29,2	26,5	24,2
Giới hạn tái lập $R$ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1,90	1,74	3,10	2,34	3,35	2,58
Độ thu hồi, %	-	-	65	64	68	70

**CHÚ THÍCH** Độ thu hồi của ocratoxin A được thêm vào mẫu lúa mạch đen không thoả mãn các tiêu chuẩn của CEN/TC 275/WG 5. Do đó, tiêu chuẩn này không thể áp dụng cho acratoxin A trong hạt lúa mạch đen.

## Phụ lục B

(tham khảo)

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 5725:1986 Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.
- [2] AOAC INTERNATIONAL Official Methods of Analysis 16th Ed 1995, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Method 991.44.
- [3] Nordic Committee on Food Analysis (1992) No 143. Ochratoxin A. Liquid chromatographic determination in barley and maize.
- [4] Nesheim, S., Stack, M.E., Trucksess, M.W., Eppley, R.M. and Krogh, P.: Rapid solvent-efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley and kidney: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1992, 75, 481-487.
- [5] Larsson, K and Möller, T. (1996) LC-determination of ochratoxin A in barley, wheat-bran and rye with the AOAC/IUPAC/NMKL method: A NMKL collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 79, 1996, 1102-1106.
- [6] Tauchmann, F.; Mintzlaff, H.-J.; Leistner, L.: Schutzmaßnahmen beim Arbeiten mit Mykotoxinen (Protective measures for working with mycotoxins) *Alimenta* 1972, 11, 85.
- [7] Castegnaro, M., Hunt, D.C., Sansone, E.B., Schuller, P.L., Siriwardana, M.G., Telling, G.M., van Egmond, H.P., and Walker, E.A.: Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in laboratory wastes. In: IARC Scientific publication no 37, International Agency for Research on Cancer (WHO), Lyon, France; 1980, 59p.
- [8] Castegnaro, M., Barek, J., Fremy, J.M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E.B., and Telling, G.M.: Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes. In: IARC Scientific publication no 113, International Agency for Research on Cancer (WHO), Lyon, France; 1991, 63p.
- [9] van Trijp, J.M.P. and Roos, A.H.: Model for the calculation of calibration curves, RIKILT Report 91.02, January 1991.