

Phụ lục A

(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Ba phép thử liên phòng thử nghiệm, hai trong số đó được tiến hành ở cấp quốc tế (Nos.1 và 2) trên thức ăn chăn nuôi đã được trộn trước (phương pháp B) cho kết quả nêu trong bảng A.1.

Mười một phòng thử nghiệm tham gia trong phép thử lần hai đã phân tích theo phương pháp A trên mẫu thích hợp bằng mắt hoặc bằng máy đo cường độ huỳnh quang đều thu được các kết quả tương tự với kết quả tiến hành theo phương pháp B.

Bảng A.1

| Thông số | Phép thử | | |
|--|----------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| Số lượng các phòng thử nghiệm | 23 | 11 | 13 |
| Giá trị trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 162,7 | 25,4 | 13,4 |
| Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 16,9 | 2,7 | 1,7 |
| Hệ số biến thiên lặp lại, % | 10 | 11 | 13 |
| Giới hạn lặp lại ($2,83 s_r$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 47,8 | 7,6 | 4,8 |
| Độ lệch tái lập (s_R), $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 45,2 | 6,8 | 4,0 |
| Hệ số biến thiên tái lập, % | 28 | 27 | 30 |
| Giới hạn tái lập ($2,83 s_R$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 128,0 | 19,2 | 11,3 |

Thức ăn chăn nuôi – Xác định bán định lượng Aflatoxin B₁ –

Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Animal feeding stuffs – Semi-quantitative determination of Aflatoxin B₁ –

Thin-layer chromatographic methods

1 Phạm vi áp dụng

1.1 Tiêu chuẩn này qui định hai phương pháp xác định aflatoxin B₁ trong thức ăn chăn nuôi. Các phương pháp này chỉ có thể dùng để xác định bán định lượng.

1.2 Phương pháp A có thể áp dụng cho các thức ăn chăn nuôi đơn:

- các hạt có dầu và khô dầu của chúng, cụ thể là hạt lạc, cùi dừa khô, hạt lanh, hạt đậu tương, hạt cọ babassu;
- bột sắn;
- mầm ngô;
- ngũ cốc và các sản phẩm ngũ cốc;
- bột đậu;
- bã khoai tây và bột khoai tây.

Khi có mặt chất gây cản trở phép xác định theo phương pháp A, thì nên tiến hành xác định theo phương pháp B.

1.3 Phương pháp B có thể áp dụng cho thức ăn chăn nuôi đã được trộn trước và thức ăn chăn nuôi đơn mà không được đề cập trong 1.2.

Phương pháp này không áp dụng cho thức ăn chứa bã ép của cam, chanh.

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 6952:2001 (ISO 6498:1998), Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.

3 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được chiết bằng cloroform sau đó lọc. Phần dịch lọc được làm sạch trên cột silica gel.

Dịch rửa giải được làm bay hơi và cặn được hoà tan trong một thể tích qui định của cloroform hoặc hỗn hợp benzen và axetonitril.

Cho chạy sắc ký lớp mỏng một chiều đối với phương pháp A và sắc ký hai chiều đối với phương pháp B trên một phần dung dịch này.

Xác định hàm lượng aflatoxin B₁ bằng mắt hoặc bằng đo huỳnh quang, bằng cách kiểm tra sắc ký đồ dưới ánh sáng tử ngoại và so sánh với aflatoxin B₁ chuẩn đã biết trước nồng độ được chấm trên cùng một tấm với dịch chiết của phần mẫu thử.

Việc hình thành dẫn xuất hemiaxetal khẳng định sự có mặt của aflatoxin B₁.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, và nước cất hoặc nước đã khử ion hoặc nước ít nhất có độ tinh khiết tương đương.

4.1 Cloroform, làm ổn định bằng 0,5 % đến 1,0 % etanol 96% (phần thể tích).

4.2 n-Hexan.

4.3 Ete dietyl, dạng khan, không chứa peroxit.

4.4 Benzen/axetonitril, hỗn hợp (98 + 2).

Trộn 98 thể tích benzen với 2 thể tích axetonitril.

4.5 Cloroform /metanol, hỗn hợp (97 + 3).

Trộn 97 thể tích cloroform với 3 thể tích metanol.

4.6 Dung môi khai triển (developing solvents).

Các dung môi phải được đựng trong bình có nắp đậy. Khi qui định dùng bình bão hòa, thì những bình này được lót bằng giấy hút ẩm và để cho phần trong bình bão hòa hơi dung môi.

4.6.1 Cloroform /axeton, hỗn hợp (90 + 10).

Trộn 90 thể tích cloroform với 10 thể tích axeton trong bình chưa bão hòa.

4.6.2 Ete dietyl /metanol/nước, hỗn hợp (96 + 3 + 1).

Trộn 96 thể tích ete dietyl với 3 thể tích metanol và 1 thể tích nước trong bình chưa bão hòa.

4.6.3 Ete dietyl /metanol/nước, hỗn hợp (94 + 4,5 + 1,5).

Trộn 94 thể tích ete dietyl với 4,5 thể tích metanol và 1,5 thể tích nước trong bình đã bão hòa.

4.6.4 Cloroform /metanol, hỗn hợp (94 + 6).

Trộn 94 thể tích cloroform với 6 thể tích metanol trong bình đã bão hòa.

4.6.5 Cloroform /metanol, hỗn hợp (97 + 3).

Trộn 97 thể tích cloroform với 3 thể tích metanol trong bình đã bão hòa.

4.7 Silica gel, dùng cho sắc ký cột, cỡ hạt từ 0,05 mm đến 0,20 mm.

4.8 Silica gel, G-HR hoặc loại tương đương, dùng cho sắc ký lớp mỏng.

4.9 Diatomit (Hyflosupercel), đã rửa sạch bằng axit.

4.10 Natri sunfat, dạng hạt khan.

4.11 Axit trifluoroaxetic.

4.12 Khí trơ, ví dụ khí nitơ.

4.13 Axit sulfuric, dung dịch 50 % (phần thể tích).

4.14 Aflatoxin B₁, dung dịch chuẩn chứa khoảng 0,1µg aflatoxin B₁ trên mililit, pha trong cloroform (4.1) hoặc trong hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4).

CẢNH BÁO - Aflatoxin là chất gây ung thư do vậy phải được bảo quản hết sức cẩn thận.

Chuẩn bị và kiểm tra dung dịch như sau:

4.14.1 Chuẩn bị dung dịch gốc và xác định nồng độ

Chuẩn bị dung dịch aflatoxin B₁ trong cloroform (4.1) hoặc trong hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4) sao cho có nồng độ khoảng từ 8 µg/ml đến 10 µg/ml. Dùng máy đo phổ (5.9) để xác định phổ hấp thụ ở bước sóng từ 330 nm đến 370 nm.

Đo độ hấp thụ (A) tại bước sóng 363 nm đối với dung dịch cloroform hoặc tại bước sóng 348 nm đối với dung dịch hỗn hợp benzen/axetonitril.

Tính nồng độ aflatoxin B₁ của dung dịch, tính bằng microgam trên lít dung dịch, theo công thức sau đây:

a) đối với dung dịch cloroform

$$\frac{312 \times A \times 1\,000}{22\,300}$$

b) đối với dung dịch hỗn hợp benzen/axetonitril

$$\frac{312 \times A \times 1\,000}{19\,800}$$

4.14.2 Pha loãng

Pha loãng dung dịch gốc (4.14.1) thích hợp, tránh ánh sáng mặt trời, để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ aflatoxin B₁ khoảng 0,1 µg/ml.

Dung dịch có thể giữ trong 2 tuần nếu bảo quản trong tủ lạnh ở 4 °C.

4.14.3 Kiểm tra độ tinh khiết sắc ký của dung dịch

Trên tấm sắc ký (5.7) chấm một điểm 5 µl dung dịch chuẩn aflatoxin B₁ có nồng độ từ 8 µg/ml đến 10 µg/ml (4.14.1). Chạy sắc ký như 7.5.1. Dưới ánh sáng tử ngoại, sắc đồ sẽ cho thấy duy nhất một điểm và vùng lưu giữ gốc không phát huỳnh quang.

4.15 Aflatoxin B₁ và B₂ (xem cảnh báo trong 4.14) các dung dịch dùng để kiểm tra định tính chứa khoảng 0,1 µg aflatoxin B₁ và B₂ trên millilit cloroform (4.1) hoặc trên millilit hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4).

Các nồng độ này chỉ dùng để tham khảo. Chúng phải được chỉnh sao cho thu được cường độ huỳnh quang giống nhau đối với cả hai loại aflatoxin (xem 7.5.1).

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy nghiền/trộn.

5.2 Sàng, có cỡ lỗ 1,0 mm.

Về chi tiết, xem ISO 565¹⁾.

5.3 Máy lắc hoặc máy khuấy từ.

5.4 **Cột sắc ký**, bằng thủy tinh (đường kính trong 22 mm, dài 300 mm), với bình chứa 250 ml, có khoá bằng polytetrafluoroetylen và phía dưới cột được nút bằng cotton hoặc bằng sợi thủy tinh.

5.5 **Thiết bị cất quay chân không**, có bình cầu đáy tròn 500 ml.

5.6 **Thiết bị sắc ký lớp mỏng (TLC)**, là thiết bị cần để chuẩn bị các tấm sắc ký (5.7) và dụng cụ chấm các điểm (pipet mao dẫn hoặc microxiranh), bình khai triển và thiết bị phun axit sulfuric (4.13) lên các tấm sắc ký.

5.7 **Các tấm TLC bằng thủy tinh**, 200 mm x 200 mm được chuẩn bị như sau (năm tấm là đủ).

Cho 30 g silica gel (4.8) vào bình nón, thêm 60 ml nước, đập nắp và lắc trong 1 phút. Phun đều huyền phù này lên các tấm kính sao cho thu được lớp dày đều 0,25 mm. Để khô trong không khí sau đó bảo quản trong bình hút ẩm có chứa silica gel. Khi sử dụng, hoạt hóa các tấm này bằng cách đặt trong tủ sấy ở 110 °C trong 1 giờ.

Có thể sử dụng các tấm silica gel phù hợp có sẵn, nếu chúng cho kết quả tương đương với kết quả của những tấm được chuẩn bị như đã nêu ở trên.

5.8 Đèn tử ngoại bước sóng dài (360 nm)

Cường độ phát ra sẽ giúp dễ dàng nhận ra điểm 1,0 ng aflatoxin B, trên tấm TLC ở cách đèn một khoảng 10 cm.

CẢNH BÁO – Ánh sáng tử ngoại rất nguy hiểm đối với mắt. Phải đeo kính bảo vệ.

5.9 **Quang phổ kế**, phù hợp cho việc đo phổ trong vùng tử ngoại.

5.10 **Máy đo cường độ huỳnh quang** (tuỳ chọn).

5.11 **Giấy lọc gấp nếp**.

5.12 **Ống chia độ**, dung tích 10,0 ml và có nút bằng polyetylen.

¹⁾ ISO 565 Sàng thử nghiệm – Lưới dệt bằng sợi kim loại, tấm được đục lỗ và tấm đúc bằng điện. Kích thước danh nghĩa của lỗ.

5.13 Bình nón, dung tích 500 ml, có nút thủy tinh mài.

5.14 Pipet, dung tích 50 ml.

5.15 Cân phân tích.

6 Lấy mẫu

Lấy mẫu phòng thử nghiệm từ vật liệu cần lấy mẫu theo tiêu chuẩn đối với từng loại vật liệu liên quan, trừ khi việc lấy mẫu để xác định aflatoxin không nằm trong phạm vi áp dụng của tiêu chuẩn đó. Nếu không có tiêu chuẩn nào thích hợp, thì các bên liên quan phải thỏa thuận với nhau dựa theo các đặc tính của vật liệu cần lấy mẫu.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

7.1.1 Nếu mẫu chứa trên 5 % chất béo thì phải khử chất béo bằng xăng nhẹ trước khi nghiền.

Trong trường hợp này, các kết quả phân tích sẽ được biểu thị dưới dạng khối lượng của mẫu không khử chất béo.

7.1.2 Nghiền mẫu phòng thử nghiệm sao cho lọt hết qua sàng (5.2). Trộn kỹ. Xem TCVN 6952:2001 (ISO 6498:1998).

7.2 Phần mẫu thử

Cân 50 g mẫu thử đã chuẩn bị, chính xác đến 0,01 g, cho vào bình nón (5.13).

7.3 Chiết

Cho 25 g diatomit (4.9), 25 ml nước và 250 ml cloroform (4.1) được đong chính xác bằng ống đong vào phần mẫu thử (7.2). Đậy nắp và lắc hoặc khuấy trong 30 phút bằng máy lắc hoặc máy khuấy từ (5.3). Lọc qua giấy lọc gấp nếp (5.11), chú ý loại bỏ 10 ml dịch lọc đầu tiên và thu lấy ít nhất 50 ml dịch lọc tiếp theo.

7.4 Làm sạch cột

7.4.1 Chuẩn bị cột

Đổ cloroform (4.1) đến hai phần ba ống sắc ký (5.4) và thêm 5 g natri sunfat (4.10). Đảm bảo sao cho bề mặt natri sunfat được phẳng, sau đó từ từ thêm 10 g silica gel (4.7). Khuấy cẩn thận sau mỗi lần

thêm silica gel để loại bỏ bột khí. Để yên trong 15 phút, sau đó cẩn thận cho 10 g natri sunfat (4.10). Mở khoá và để cho dịch lỏng chảy xuống cho đến khi vừa ngập bề mặt lớp natri sunfat. Vận khóa lại.

7.4.2 Làm sạch

Dùng pipet (5.14) chuyển 50 ml dịch lọc thu được ở 7.3 vào bình nón 250 ml và thêm 100 ml *n*-hexan (4.2). Trộn đều và chuyển lượng hỗn hợp này vào cột, tráng bình bằng *n*-hexan. Mở khoá và cho dung dịch chảy với tốc độ dòng khoảng 8 ml/phút đến 12 ml/phút sao cho dung dịch ngập ngang bằng bề mặt trên lớp natri sunfat. Khóa vòi lại. Loại bỏ dịch lỏng thu được và rót 100 ml ete dietyl (4.3) lên cột. Mở khoá lại và để cho dịch lỏng chảy xuống đến khi ngập ngang bằng bề mặt lớp natri sunfat. Trong quá trình này phải đảm bảo không để cột bị khô.

Rửa giải bằng 150 ml hỗn hợp cloroform/metanol (4.5) và thu lấy toàn bộ dịch rửa giải vào bình 500 ml của máy cất quay (5.5). Làm bay hơi đến khô trên máy cất quay, tốt nhất là dùng dòng khí trơ (4.12) ở nhiệt độ không quá 50 °C dưới áp suất thấp.

Nếu không sẵn có máy cất quay thì thêm chất trợ sôi và cho bay hơi hoàn toàn đến khô trong nồi cách thủy.

Dùng cloroform (4.1) hoặc hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4) để chuyển lượng cặn vào ống chia độ 10 ml (5.12). Cho dung dịch bay hơi một lần nữa, ví dụ trên nồi cách thủy, tốt nhất là dùng dòng khí trơ (4.12) và chỉnh thể tích đến 2,0 ml bằng cloroform (4.1) hoặc hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4).

7.5 Sắc ký lớp mỏng

7.5.1 Phương pháp A – Sắc ký lớp mỏng một chiều

7.5.1.1 Chọn dung môi

Việc chọn dung môi (4.6.1, 4.6.2, 4.6.3, 4.6.4, hoặc 4.6.5) phải thực hiện trước để đảm bảo rằng các aflatoxin B₁ và B₂ được tách ra hoàn toàn khi chạy tấm sắc ký, điều này phụ thuộc vào các tấm được sử dụng.

Chấm 25 µl dung dịch định tính (4.15) lên các tấm đã chuẩn bị sẵn (5.7) (mỗi tấm dùng cho một dung môi cần kiểm tra).

Tiến hành theo 7.5.1.2 để chạy sắc ký, cho bay hơi và chiếu ánh sáng bằng đèn tử ngoại.

Với dung môi thích hợp, thì sẽ tạo ra hai điểm phân tách.

7.5.1.2 Cách tiến hành

Dùng pipet mao quản hoặc microxyranh chấm các thể tích dung dịch chuẩn aflatoxin B₁ lên tấm TLC (5.7) với các điểm cách mép 20 mm, cách nhau 20 mm và chấm dịch chiết dưới đây:

- 10 µl, 15 µl, 20 µl, 30 µl và 40 µl dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14);
- 10 µl dịch chiết thu được trong 7.4.2 và chấm chồng lên điểm 20 µl dung dịch chuẩn aflatoxin B₁ (4.14);

- 10 µl và 20 µl dịch chiết thu được trong 7.4.2.

Chạy sắc ký ở nơi tối với dung môi đã chọn (xem 7.5.1.1).

Lấy tấm sắc ký ra khỏi bình, để dung môi bay hơi ở nơi tối, sau đó đem kiểm tra dưới ánh sáng tử ngoại, đặt tấm sắc ký cách đèn (5.8) 10 cm. Các vết aflatoxin B₁ sẽ cho huỳnh quang màu xanh da trời.

7.5.2 Phương pháp B - Sắc ký lớp mỏng hai chiều

7.5.2.1 Chấm các dung dịch (xem Hình 1)

Kẻ hai đường thẳng trên tấm sắc ký (5.7) và song song với hai cạnh tấm (một đường cách cạnh 50 mm, đường kia cách cạnh 60 mm) để thiết lập giới hạn sự di chuyển của dung môi. Dùng pipet mao quản hoặc microxyranh chấm các dung dịch sau đây lên tấm sắc ký:

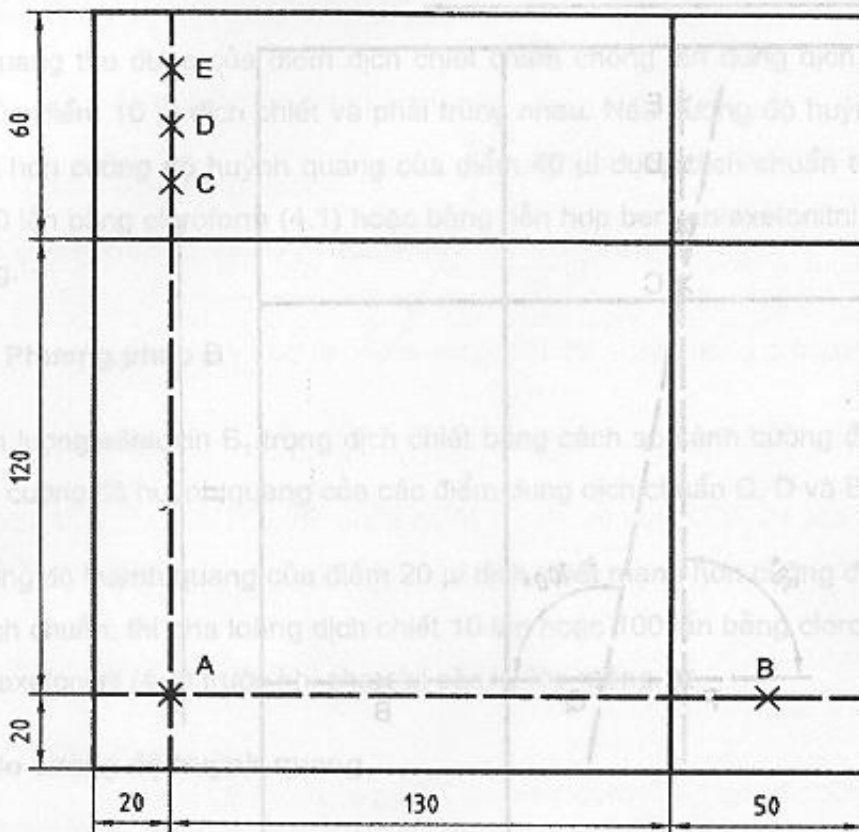
- tại điểm A: 20 µl dịch chiết mẫu được đã làm sạch thu được trong 7.4.2;
- tại điểm B: 20 µl dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14);
- tại điểm C: 10 µl dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14);
- tại điểm D: 20 µl dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14);
- tại điểm E: 40 µl dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14).

Làm khô dưới luồng không khí hoặc khí trơ (4.12). Các vết thu được phải có đường kính khoảng 5 mm.

7.5.2.2 Chạy sắc ký (xem Hình 1)

Chạy sắc ký theo chiều I ở nơi tối, sử dụng dung môi khai triển (4.6.3) (lớp dung môi dày 1 cm trong bình đã bão hòa) cho đến khi dung môi chạm tới đường giới hạn. Lấy tấm sắc ký ra khỏi bình, để khô ở nơi tối nhiệt độ phòng ít nhất là 15 phút.

II

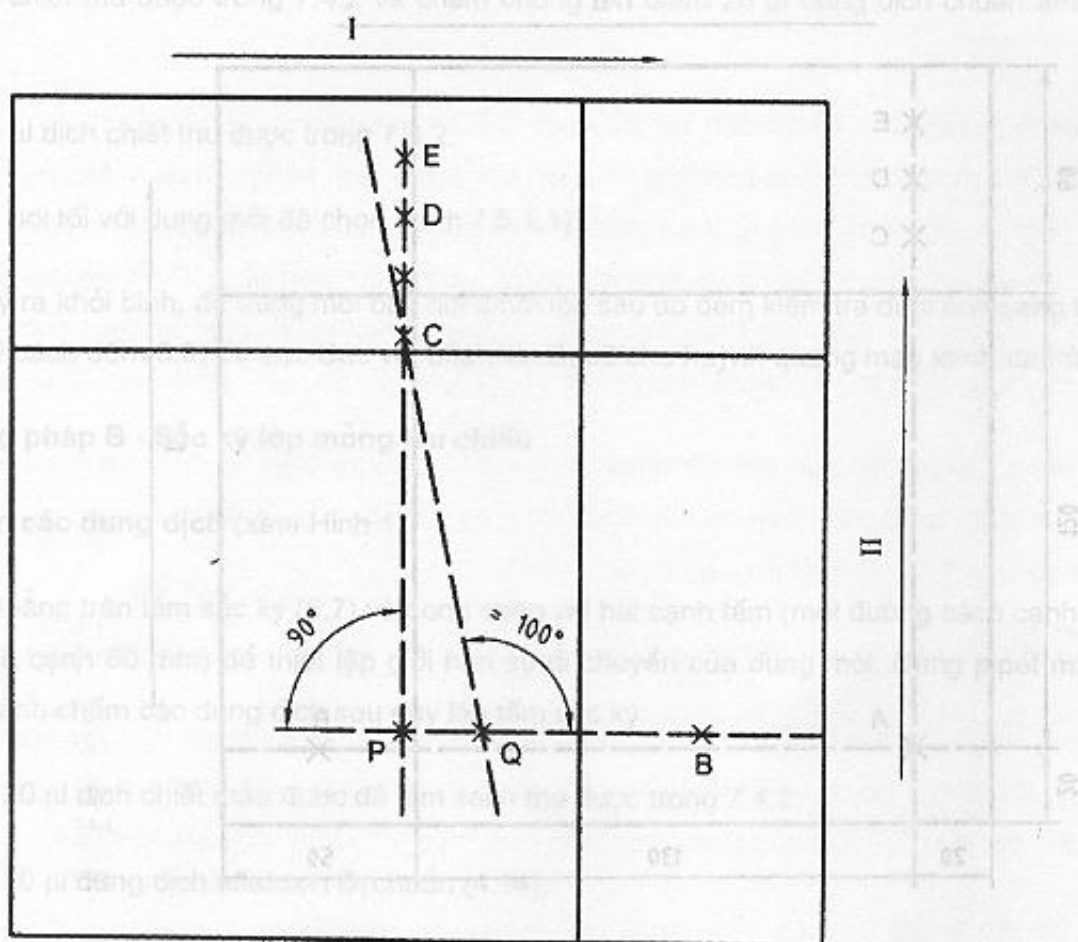


Hình 1 – Chấm các dung dịch

Sau đó chạy sắc ký theo chiều II ở nơi tối, sử dụng dung môi khai triển (4.6.1) (lớp dung môi dày 1 cm trong trong bình chưa bão hòa) đến khi dung môi chạm tới đường giới hạn. Lấy tấm sắc ký ra khỏi bình và để khô ở nơi tối ở nhiệt độ môi trường.

7.5.2.3 Diễn giải về sắc phổ (xem hình 2)

Kiểm tra sắc phổ dưới ánh sáng tử ngoại, bằng cách đặt tấm sắc ký cách đèn (5.8) 10 cm. Xác định vị trí của các điểm huỳnh quang màu xanh da trời B, C, D và E của aflatoxin B, từ dung dịch chuẩn và kẻ hai đường thẳng mờ đi qua các điểm này tạo thành các góc vuông với hướng chạy sắc ký. Giao điểm P của hai đường này là điểm nghi ngờ của aflatoxin B, có trong dịch chiết tại điểm chấm A (xem Hình 1). Tuy nhiên, vị trí thực của điểm aflatoxin B, có thể nằm tại điểm Q là giao điểm của hai đường kẻ ở trên tạo với nhau một góc khoảng 100° theo thứ tự đi qua điểm B và điểm C.



Hình 2 – Diễn giải về sắc phổ

7.5.2.4 Sắc ký bổ sung

Kẻ hai đường thẳng trên tấm sắc ký mới (5.7) giao nhau và song song với hai cạnh của tấm sắc ký như Hình 1 và tại điểm A chấm 20 μl dịch chiết đã được làm sạch thu được trong 7.4.2 và chấm chồng lên nó 20 μl dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14). Chạy sắc ký như ở 7.5.2.2. Kiểm tra sắc phổ dưới ánh sáng tử ngoại và kiểm tra rằng:

- các vết aflatoxin B₁ của dịch chiết và của dung dịch chuẩn phải trùng nhau, và
- huỳnh quang tại điểm này phải mạnh hơn huỳnh quang tại điểm aflatoxin B₁ đã tiến hành ở điểm Q trên tấm thứ nhất.

7.6 Xác định

7.6.1 Xác định bằng mắt

7.6.1.1 Phương pháp A

Xác định lượng aflatoxin B₁ trong dịch chiết bằng cách so sánh cường độ huỳnh quang tại các điểm của dịch chiết với cường độ huỳnh quang tại các điểm của dung dịch chuẩn. Dùng phép nội suy, nếu cần.

Huỳnh quang thu được của điểm dịch chiết chấm chống lên dung dịch chuẩn phải mạnh hơn huỳnh quang của điểm 10 µl dịch chiết và phải trùng nhau. Nếu cường độ huỳnh quang của điểm 10 µl dịch chiết lớn hơn cường độ huỳnh quang của điểm 40 µl dung dịch chuẩn thì pha loãng dịch chiết 10 lần hoặc 100 lần bằng cloroform (4.1) hoặc bằng hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4) trước khi chạy lại sắc ký lớp mỏng.

7.6.1.2 Phương pháp B

Xác định lượng aflatoxin B₁ trong dịch chiết bằng cách so sánh cường độ huỳnh quang của điểm dịch chiết với cường độ huỳnh quang của các điểm dung dịch chuẩn C, D và E. Dùng phép nội suy, nếu cần.

Nếu cường độ huỳnh quang của điểm 20 µl dịch chiết mạnh hơn cường độ huỳnh quang của điểm 40 µl dung dịch chuẩn, thì pha loãng dịch chiết 10 lần hoặc 100 lần bằng cloroform (4.1) hoặc bằng hỗn hợp benzen/axetonitril (4.4) trước khi chạy lại sắc ký lớp mỏng.

7.6.2 Đo cường độ huỳnh quang

Đo cường độ huỳnh quang của điểm aflatoxin B₁ bằng máy đo cường độ huỳnh quang (5.10) tại bước sóng kích thích là 365 nm và bước sóng phát xạ là 443 nm.

Đối với phương pháp A, xác định lượng aflatoxin B₁ trong các điểm dịch chiết bằng cách so sánh cường độ huỳnh quang của các điểm dịch chiết với cường độ huỳnh quang của các điểm dung dịch chuẩn, và đối với phương pháp B, thì xác định hàm lượng aflatoxin B₁ của điểm dịch chiết bằng cách so sánh cường độ huỳnh quang của điểm dịch chiết với cường độ huỳnh quang của các điểm dung dịch chuẩn C, D và E.

7.7 Khẳng định sự có mặt của aflatoxin B₁

7.7.1 Yêu cầu chung

Khẳng định sự nhân dạng của aflatoxin B₁ trong dịch chiết bằng phép thử giả định với axit sulfuric (xem 7.7.2) và nếu kết quả của phép thử này là dương tính thì tiến hành phép thử khẳng định (7.7.3). Nếu kết quả phép thử giả định với axit sulfuric là âm tính thì không cần thiết phải tiến hành phép thử khẳng định vì trong trường hợp này không có mặt aflatoxin B₁.

7.7.2 Phép thử giả định bằng axit sulfuric

Phun dung dịch axit sulfuric (4.13) lên tấm sắc ký thu được trong 7.5.1 hoặc ở 7.5.2. Huỳnh quang của các điểm aflatoxin B₁ sẽ chuyển từ màu xanh da trời sang màu vàng dưới ánh sáng tử ngoại.

7.7.3 Phép thử khẳng định

7.7.3.1 Hình thành aflatoxin B₁-hemiacetal (aflatoxin B_{2a})

Trong trường hợp thức ăn chăn nuôi đơn chất và có màu nhạt thì dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng một chiều được mô tả trong 7.7.3.2. Trường hợp những thức ăn đơn sắc, những thức ăn đã được trộn trước hoặc nghi ngờ thì dùng phương pháp sắc ký lớp mỏng hai chiều được mô tả trong 7.7.3.3.

7.7.3.2 Sắc ký lớp mỏng một chiều

Kẻ một đường thẳng trên tấm sắc ký (5.7) chia thành hai phần bằng nhau. Trên mỗi phần chấm, cách mép dưới 20 mm và khoảng cách giữa các chấm là 15 mm các thể tích dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn và dịch chiết dưới đây:

- 25 μ l dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14);
- một thể tích dịch chiết thu được trong 7.4.2 chứa khoảng 2,5 ng aflatoxin B₁;
- 25 μ l dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14) và chấm chồng lên nó một thể tích dịch chiết thu được trong 7.4.2 chứa khoảng 2,5 ng aflatoxin B₁.

Chọn một trong hai phần, chấm chồng lên những điểm trước 1 μ l đến 2 μ l axit trifluoroacetic (4.11). Làm khô trong không khí ở nhiệt độ môi trường.

Chạy sắc ký ở nơi tối, dùng một trong các dung môi khai triển (4.6). Chọn dung môi trước khi chạy sắc ký. Hệ dung môi phải đảm bảo sao cho aflatoxin B₁-hemiacetal (aflatoxin B_{2a}) được tách hoàn toàn ra khỏi các chất cản trở. Dung môi chạy khoảng 120 mm.

Để dung môi bay hơi ở nơi tối, sau đó phun axit sulfuric (4.13) lên phần tấm chưa được xử lý bằng axit trifluoroacetic. Kiểm tra tấm sắc ký dưới ánh sáng tử ngoại.

Có thể aflatoxin B₁ được khẳng định nếu:

- giá trị R_f của dẫn xuất aflatoxin B₁ từ mẫu chiết tương ứng với giá trị của dung dịch chuẩn;
- cường độ huỳnh quang của aflatoxin B₁ của dung dịch chuẩn chấm chồng lên dịch chiết mạnh hơn cường độ huỳnh quang của aflatoxin B₁ của dịch chiết.

Vì các điểm huỳnh quang của dịch chiết có cùng giá trị R_f với điểm huỳnh quang của aflatoxin B_1 -hemiaxetal có thể dẫn đến sự nhầm lẫn qua việc đọc sắc phổ, chính vì vậy phải kiểm tra sự có mặt của chúng trên phần được xử lý bằng axit sulfuric.

Trong trường hợp nghi ngờ, phải sử dụng phương pháp sắc ký lớp mỏng hai chiều (7.7.3.3) để khẳng định.

7.7.3.3 Sắc ký lớp mỏng hai chiều (xem Hình 3)

7.7.3.3.1 Chấm các dung dịch

Kẻ hai đường thẳng trên tấm sắc ký (5.7) song song với hai cạnh của tấm (cách mỗi cạnh 60 mm) để thiết lập giới hạn sự di chuyển của dung môi. Dùng pipet mao quản hoặc microxyrăng chấm các dung dịch sau đây lên tấm sắc ký:

- tại điểm A: một thể tích dịch chiết lấy từ mẫu được làm sạch ở 7.4.2 chứa khoảng 2,5 ng aflatoxin B_1 và một giọt (1 μ l đến 2 μ l) axit trifluoroaxetic (4.11);
- tại điểm B và điểm C: 25 μ l dung dịch aflatoxin B_1 chuẩn (4.14) và một giọt axit trifluoroaxetic (4.11).

Làm khô trong không khí ở nhiệt độ môi trường.

7.7.3.3.2 Chạy sắc ký

Chạy sắc ký theo chiều II (xem Hình 3) ở nơi tối, sử dụng dung môi khai triển (4.6.2) (lớp dung môi khoảng 1 cm trong bình chưa bão hòa) cho đến khi dung môi chạm tới đường giới hạn. Lấy tấm sắc ký ra khỏi bình và để khô nơi tối ở nhiệt độ môi trường trong 5 phút.

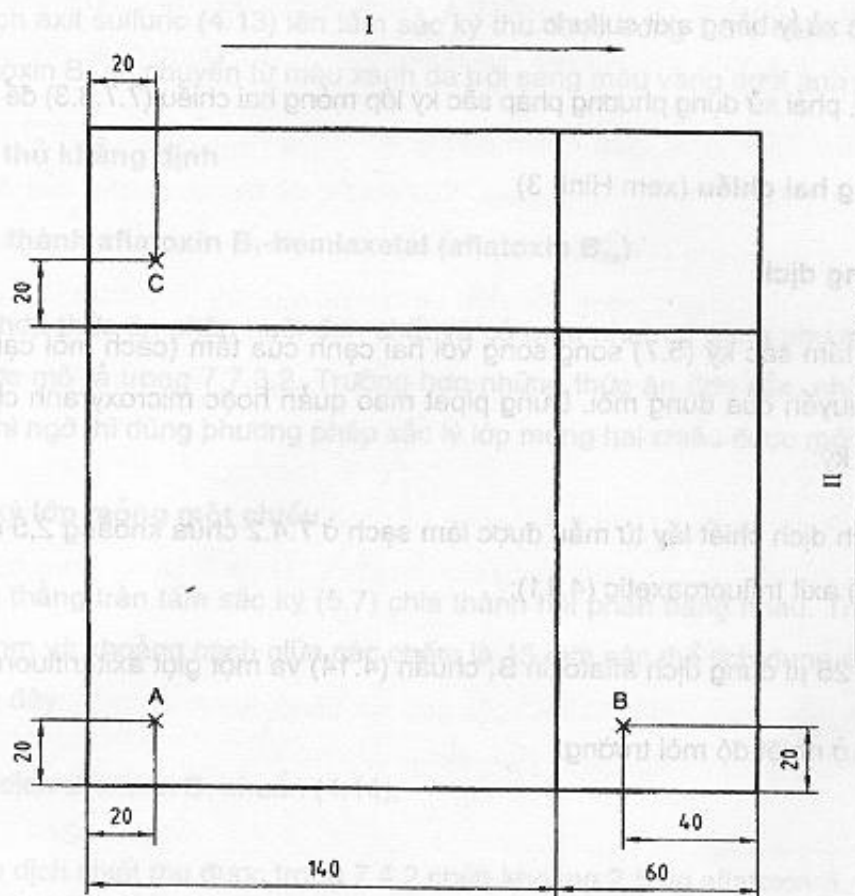
Sau đó chạy sắc ký theo chiều I, ở nơi tối, sử dụng dung môi khai triển (4.6.1) (lớp dung môi khoảng 1 cm trong bình chưa bão hòa) cho đến khi dung môi chạm tới đường giới hạn. Lấy tấm sắc ký ra khỏi bình, để khô ở nhiệt độ môi trường.

7.7.3.3.3 Diễn giải về sắc phổ

Kiểm tra sắc phổ dưới ánh sáng cực tím của đèn (5.8) và kiểm tra các đặc tính sau đây:

a) Sự xuất hiện điểm huỳnh quang màu xanh da trời của aflatoxin B_1 -hemiaxetal và đôi khi điểm huỳnh quang màu xanh da trời nhạt của aflatoxin B_1 không phản ứng với axit trifluoroaxetic, các điểm này là của dung dịch chuẩn chấm ở điểm C (di chuyển theo hướng I) và của điểm B (di chuyển theo hướng II);

b) Sự xuất hiện các điểm tương tự như các điểm mô tả ở a) là của dịch chiết chấm tại điểm A. Vị trí của các điểm này được xác định nhờ các điểm của dung dịch chuẩn chấm ở điểm B và C. Cường độ huỳnh quang của các điểm aflatoxin B_1 -hemiaxetal của dịch chiết với dung dịch chuẩn chấm tại điểm B và C phải so sánh được.



Hình 3 – Phép thử khảng định

7.8 Số lần xác định

Tiến hành hai lần xác định trên cùng mẫu thử nghiệm.

8 Tính và biểu thị kết quả

8.1 Xác định bằng mắt

Hàm lượng aflatoxin B₁ được biểu thị theo microgam trên kilogram mẫu, tính bằng công thức sau đây:

$$\frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2}$$

trong đó

C là nồng độ của aflatoxin B₁ trên mililit dung dịch chuẩn (4.14) (khoảng 0,1 µg/ml), tính bằng microgam;

m là khối lượng của phần mẫu thử tương ứng với thể tích dịch chiết được đưa lên cột để làm sạch (10,0 g), tính bằng gam;

V_1 là thể tích cuối cùng của dịch chiết kể cả những lẫn pha loãng nếu có, tính bằng microlit;

V_2 và V_3 là thể tích tương ứng của dịch chiết và dung dịch aflatoxin B₁ chuẩn (4.14) chấm lên tấm có cường độ huỳnh quang giống nhau, tính bằng microlit.

8.2 Đo bằng máy đo cường độ huỳnh quang

Hàm lượng aflatoxin B₁, được biểu thị bằng microgam trên kilogam mẫu, tính theo công thức sau đây:

$$\frac{m_1 \cdot V_1}{m \cdot V_2}$$

trong đó

m là khối lượng của phần mẫu thử tương ứng với thể tích của dịch chiết được đưa lên cột để làm sạch (10,0 g), tính bằng gam;

m_1 là khối lượng aflatoxin B₁ trong điểm chấm dịch chiết (kể cả thể tích V_2) được suy ra từ các phép đo, tính bằng nanogam;

V_1 là thể tích cuối cùng của dịch chiết kể cả những phần pha loãng nếu có, tính bằng microlit;

V_2 là thể tích của dịch chiết chấm lên tấm sắc ký (10 μ l hoặc 20 μ l), tính bằng microlit.

9 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của các phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được đưa ra trong phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền (matrix) khác với các giá trị đã nêu.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng (A hoặc B), viện dẫn tiêu chuẩn này;
- phương pháp xác định (bằng mắt hoặc bằng máy đo cường độ huỳnh quang);
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- kết quả thử nghiệm thu được.