

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 14436:2025

BS EN 17279:2019

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC
AFLATOXIN B₁, DEOXYNIVALENOL, FUMONISIN B₁ VÀ B₂,
OCHRATOXIN A, T-2 TOXIN, HT-2 TOXIN VÀ
ZEARALENON TRONG THỰC PHẨM (KHÔNG BAO GỒM
THỰC PHẨM DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH VÀ TRẺ NHỎ)
BẰNG SẮC KÝ LỎNG-HAI LẦN KHỐI PHỔ (LC-MS/MS)**

*Foodstuffs – Multimethod for the screening of aflatoxin B₁, deoxynivalenol,
fumonisin B₁ and B₂, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone in foodstuffs,
excluding foods for infants and young children, by LC-MS/MS*

HÀ NỘI – 2025

Lời nói đầu

TCVN 14436:2025 hoàn toàn tương đương với BS EN 17279:2019;

TCVN 14436:2025 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Ủy ban Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng Quốc gia thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Độc tố vi nấm là chất chuyển hóa của nấm có thể xuất hiện trong các loại thực phẩm khác nhau. Ngũ cốc và các sản phẩm ngũ cốc, lạc, quả sậy và các sản phẩm có nguồn gốc liên quan có khả năng bị ảnh hưởng bởi độc tố vi nấm được nêu trong tiêu chuẩn này (aflatoxin B₁, deoxynivalenol, fumonisin B₁ và B₂, ochratoxin A, HT-2 toxin và T-2 toxin và zearalenon).

CẢNH BÁO 1 – Cần có các biện pháp phòng ngừa và bảo vệ thích hợp khi thực hiện các bước làm việc với hóa chất độc hại.

CẢNH BÁO 2 – Việc sử dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, hoạt động và thiết bị nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không nhằm mục đích giải quyết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này có trách nhiệm thiết lập các biện pháp thực hành an toàn và sức khỏe phù hợp cũng như xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng.

Thực phẩm – Phương pháp sàng lọc aflatoxin B₁, deoxynivalenol, fumonisin B₁ và B₂, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin và zearalenon trong thực phẩm (không bao gồm thực phẩm dành cho trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ) bằng sắc ký lỏng-hai lần khối phổ (LC-MS/MS)

Foodstuffs – Multimethod for the screening of aflatoxin B₁, deoxynivalenol, fumonisin B₁ and B₂, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin and zearalenone in foodstuffs, excluding foods for infants and young children, by LC-MS/MS

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sàng lọc để xác định aflatoxin B₁, deoxynivalenol, fumonisin B₁ và B₂, ochratoxin A, T-2 toxin, HT-2 toxin và zearalenon trong thực phẩm, bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp với hai lần khối phổ (MS/MS).

Mục đích của phương pháp sàng lọc là để xác định nồng độ nhất định đã biết (nồng độ đích sàng lọc, STC) có bị vượt quá hay không. Kết quả sàng lọc là “âm tính” hoặc “ngghi ngờ”. “Âm tính” (sàng lọc âm tính) có nghĩa là độc tố vi nấm đích không được phát hiện hoặc có khả năng xuất hiện nhưng dưới STC. “Ngghi ngờ” (sàng lọc dương tính) có nghĩa là vượt quá giá trị ngưỡng đã thiết lập và mẫu có thể chứa một hoặc nhiều độc tố vi nấm ở nồng độ cao hơn STC.

Để xác định đầy đủ và định lượng chính xác, cần có phương pháp phân tích định lượng khẳng định, phương pháp này nằm ngoài phạm vi của tiêu chuẩn này.

Phương pháp trong tiêu chuẩn này phù hợp với nhiều loại thực phẩm khác nhau và đã được xác nhận giá trị sử dụng cho các nền mẫu đại diện từ bốn nhóm hàng hóa (xem dữ liệu chi tiết trong Phụ lục C):

- hàm lượng tinh bột và/hoặc protein cao, hàm lượng nước và chất béo thấp: lúa mì, hỗn hợp ngũ cốc, bột mì và bánh bột ngô;
- hàm lượng dầu cao: lạc;

TCVN 14436:2025

- hàm lượng đường cao và hàm lượng nước thấp: quả sung sấy;
- hàm lượng nước cao: nước nho.

Trong quá trình xác nhận giá trị sử dụng, các giá trị ngưỡng được thiết lập cho các nồng độ đích sàng lọc sau đây:

- aflatoxin B₁: 2 µg/kg đến 5 µg/kg;
- deoxynivalenol: 250 µg/kg đến 865 µg/kg;
- fumonisin B₁: 200 µg/kg đến 790 µg/kg;
- fumonisin B₂: 110 µg/kg đến 230 µg/kg;
- ochratoxin A: 4 µg/kg đến 9 µg/kg;
- T-2 toxin: 25 µg/kg;
- HT-2 toxin: 25 µg/kg đến 50 µg/kg;
- zearalenon: 30 µg/kg đến 100 µg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này không có thuật ngữ nào được định nghĩa.

4 Nguyên tắc

Các độc tố vi nấm được chiết ra khỏi mẫu đã được đồng nhất, sau khi thêm nước và ly tâm với acetonitril đã acid hóa. Sau khi có sự phân tách pha do muối gây ra, tiến hành ly tâm, dịch chiết acetonitril được pha loãng với nước, lọc và được phân tích bằng HPLC kết hợp với MS/MS. Tín hiệu tương đối của từng độc tố vi nấm với chất tương đồng có gần đồng vị được thêm vào dịch chiết sau cùng ở nồng độ đích sàng lọc (STC) được kiểm tra với giá trị ngưỡng đã thiết lập.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích được công nhận và nước đạt loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Các dung môi phải đạt chất lượng dùng cho phân tích LC, trừ khi có quy định khác.

5.1 Nước, đã khử ion.

5.2 Nước, loại dùng cho LC-MS, nước cất hai lần hoặc nước loại 1 theo TCVN 4851 (ISO 3696).

5.3 Acetonitril, tinh khiết phân tích

5.4 Acid acetic, có độ tinh khiết lớn hơn 98 % (khối lượng).

5.5 Magnesi sulfat ($MgSO_4$), khan, tinh khiết phân tích

5.6 Aflatoxin B₁ (AB1), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.7 Deoxynivalenol (DON), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.8 Fumonisin B₁ (FB1), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.9 Fumonisin B₂ (FB2), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.10 HT-2 toxin (HT-2), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.11 Ochratoxin A (OTA), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.12 T-2 toxin (T-2), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.13 Zearalenon (ZEA), ví dụ: tinh thể, dạng màng hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.14 ¹³C Aflatoxin B1 (¹³C-AB1), ví dụ: dung dịch $\rho = 0,5$ mg/L, trong acetonitril.

5.15 ¹³C Deoxynivalenol (¹³C-DON), ví dụ: dung dịch $\rho = 25$ mg/L, trong acetonitril.

5.16 ¹³C Fumonisin B1 (¹³C-FB1), ví dụ: dung dịch $\rho = 25$ mg/L, trong acetonitril/nước.

5.17 ¹³C Fumonisin B2 (¹³C-FB2), ví dụ: dung dịch $\rho = 25$ mg/L, trong acetonitril/nước.

5.18 ¹³C HT-2 toxin (¹³C-HT2), ví dụ: dung dịch $\rho = 25$ mg/L, trong acetonitril.

5.19 ¹³C Ochratoxin A (¹³C-OTA), ví dụ: dung dịch $\rho = 10$ mg/L, trong acetonitril.

5.20 ¹³C T-2 toxin (¹³C-T2), ví dụ: dung dịch $\rho = 25$ mg/L, trong acetonitril.

5.21 ^{13}C Zearalenon (^{13}C -ZEA), ví dụ: dung dịch $\rho = 25 \text{ mg/L}$, trong acetonitril.

5.22 Dung dịch chiết, acetonitril chứa 1 % acid acetic.

Cho 1 phần thể tích acid acetic (5.4) vào 99 phần thể tích acetonitril (5.3) và trộn. Dung dịch này có thể được sử dụng trong sáu tháng nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5.23 Dung dịch gốc riêng từng chất

Các dung dịch riêng từng chất được chuẩn bị bằng cách hòa tan các chất chuẩn nguyên chất (dạng rắn) trong dung môi thích hợp hoặc từ các dung dịch gốc riêng từng chất được mua. Các độc tố vi nấm nêu trong tiêu chuẩn này hòa tan tốt trong acetonitril, trừ fumonisin được khuyến nghị sử dụng hỗn hợp acetonitril và nước (50+50, phần thể tích) để chuẩn bị các dung dịch gốc riêng từng chất.

Tính nồng độ khối lượng cho từng độc tố vi nấm riêng rẽ, ρ , tính bằng ng/mL theo Công thức (1):

$$\rho = 20 \times D \times STC \quad (1)$$

Trong đó:

D là hệ số pha loãng (gam mẫu trên mỗi mililit dịch chiết cuối cùng) (mặc định $D = 0,25$), tính bằng gam trên mililit (g/mL);

STC là nồng độ đích sàng lọc (phần khối lượng) trong mẫu, tính bằng microgam trên kilogam ($\mu\text{g/kg}$).

VÍ DỤ Đối với độc tố vi nấm có nồng độ STC trong mẫu là $1\,000 \mu\text{g/kg}$, nồng độ khối lượng của độc tố vi nấm này trong dung dịch gốc có độc tố vi nấm hỗn hợp là $5\,000 \text{ ng/mL}$.

5.24 Dung dịch gốc hỗn hợp

Chuẩn bị dung dịch gốc hỗn hợp chứa tất cả các độc tố vi nấm riêng rẽ ở nồng độ khối lượng được tính theo Công thức (1), sử dụng các pipet thích hợp (6.6) và hỗn hợp acetonitril và nước (80+20, phần thể tích). Dung dịch này có thể được sử dụng trong sáu tháng nếu được bảo quản ở 4°C ở nơi tối.

Dung dịch gốc hỗn hợp này có thể được sử dụng để chuẩn bị các mẫu kiểm chứng dương (7.4).

5.25 Dung dịch nội chuẩn hỗn hợp (ISTD) (độc tố vi nấm có gắn đồng vị)

Độc tố vi nấm có gắn đồng vị thường có sẵn dưới dạng dung dịch chuẩn đã được chứng nhận. Chuẩn bị dung dịch ISTD hỗn hợp trong hỗn hợp acetonitril và nước (80+20, phần thể tích), có chứa tất cả các độc tố vi nấm có gắn đồng vị, ở nồng độ khối lượng được tính theo Công thức (1).

VÍ DỤ Đối với độc tố vi nấm có nồng độ STC trong mẫu là $10 \mu\text{g/kg}$ thì nồng độ khối lượng của chất có gắn đồng vị tương ứng trong dung dịch ISTD hỗn hợp là 50 ng/mL .

Dung dịch này có thể được sử dụng trong sáu tháng nếu được bảo quản nơi tối ở 4 °C.

Dung dịch này được sử dụng làm chất nội chuẩn và được bổ sung vào dung dịch chuẩn hỗn hợp (5.26) và từng dịch chiết mẫu (7.3).

5.26 Dung dịch chuẩn hỗn hợp.

Chuẩn bị dung dịch chuẩn hỗn hợp bằng cách gộp 1 phần thể tích dung dịch gốc độc tố vi nấm hỗn hợp (5.24) với 1 phần thể tích dung dịch ISTD hỗn hợp (5.25), 8 phần thể tích dung dịch chiết (5.22) và 10 phần thể tích nước (5.2). Thường chuẩn bị mới 400 µL cho mỗi mẻ phân tích.

VÍ DỤ Chuẩn bị trong lọ:

20 µL	dung dịch gốc hỗn hợp (5.24);
20 µL	dung dịch ISTD hỗn hợp (5.25);
160 µL	dung dịch chiết (5.22);
200 µL	nước (5.2).

Dung dịch chuẩn hỗn hợp được sử dụng để kiểm tra mức độ chính xác của phép xác định các độc tố vi nấm và các chất tương tự có gắn đồng vị (7.5.4).

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Ống ly tâm bằng polypropylen có nắp vặn hình nón, 50 mL.

6.2 Cân phân tích, chính xác đến 0,01 mg.

6.3 Cân phòng thử nghiệm, chính xác đến 0,01 g.

6.4 Máy lắc cơ học dọc hoặc ngang có thể điều chỉnh được hoặc máy lắc quay.

6.5 Máy lắc phòng thử nghiệm.

6.6 Pipet, có thể điều chỉnh được thể tích, ví dụ: 10 µL đến 100 µL và 100 µL đến 1000 µL, phù hợp với dung môi hữu cơ (ví dụ: pipet chuyển dịch dương), có đầu tip thích hợp.

6.7 Máy ly tâm, có khả năng tạo lực ly tâm tương đối là 3 000g.

6.8 Lọ nhỏ, từ 1,5 mL đến 2 mL, bằng thủy tinh hoặc polypropylen có nắp vặn.

6.9 Bộ lọc xyranh hoặc bộ lọc ly tâm, cỡ lỗ 0,20 µm đến 0,45 µm, được làm bằng nylon hoặc

polytetrafluoroethylen (PTFE).

6.10 Lọ lấy mẫu tự động, có kích thước phù hợp với bộ lấy mẫu tự động đang sử dụng, ví dụ: bằng thủy tinh có lọ chèn, lọ nhỏ có lọc (PTFE, 0,45 μm), có nắp vặn hoặc loại tương đương.

6.11 Hệ thống LC-MS/MS, với các bộ phận sau:

6.11.1 Bơm LC, có khả năng phân phối gradient nhị phân ở tốc độ dòng phù hợp với cột phân tích đang sử dụng có độ chính xác vừa đủ.

6.11.2 Hệ thống bơm, có khả năng bơm một lượng dung dịch bơm thích hợp với độ chính xác vừa đủ.

6.11.3 Cột LC, có khả năng giữ lại độc tố vi nấm đích, tốt nhất là có hệ số giữ ít nhất là hai.

6.11.4 Lò cột, có khả năng duy trì nhiệt độ không đổi.

6.11.5 Thiết bị đo phổ khối lượng hai lần (MS/MS), có khả năng ion hóa độc tố vi nấm (tạo thành các ion dương hoặc âm), thực hiện chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM) và có dải động đủ rộng.

CHÚ THÍCH Các thiết bị có khả năng đo luân phiên các ion dương và âm (chuyển đổi dương/âm) rất hữu ích vì chúng có thể bao gồm tất cả các chất cần phân tích đích trong một lần chạy.

6.11.6 Hệ thống đánh giá dữ liệu.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền mịn mẫu phòng thử nghiệm và đồng hóa mẫu.

7.2 Chiết mẫu

Lượng mẫu thử đồng nhất cần được phân tích là 5 g. Đối với các mẫu được đồng nhất bằng cách trộn hồ nhão, thì sử dụng lượng hồ nhão tương ứng với 5 g mẫu ban đầu.

Cân phần mẫu thử nêu trong Bảng 1, chính xác đến 0,01 g, cho vào ống ly tâm 50 mL (6.1).

Thêm nước (5.1) và acetonitril đã acid hóa (5.22) vào mẫu, như trong Bảng 1. Đậy ống và lắc kỹ bằng tay. Đảm bảo các mẫu khô được hòa vào trong chất lỏng.

Bảng 1 – Tạo lập mẫu

Mẫu	Phần mẫu thử g	Nước bổ sung ml	Dung dịch chiết (5.22)^d ml	MgSO₄ (5.5)^e g
Mẫu có độ ẩm < 15 % ^a	5	10	10	5
Mẫu dạng sệt 1+1 ^b	10	5	10	5
Mẫu dạng sệt 1+1,5 ^b	12,5	2,5	10	5
Mẫu dạng sệt 1+2 ^b	15	0	10	5
Mẫu dạng sệt 1+3 ^b	20	0	10	7,5
Mẫu có độ ẩm > 85 % ^c	5	5	10	5
^a ví dụ: ngũ cốc nghiền dạng bột. ^b x + y nghĩa là: x gam mẫu với y millilit nước. ^c hầu hết các loại rau quả tươi, các mẫu dạng lỏng. ^d tỷ lệ nước và dung môi chiết là 1+1, phần thể tích, ngoại trừ 'mẫu dạng sệt 1+3' (1+0,67, phần thể tích). ^e lượng magnesi sulfat là 0,5 g trên mỗi millilit tổng lượng nước (từ mẫu và được thêm vào) trong ống chiết.				

Đặt các ống vào máy lắc cơ học (6.4) và lắc trong 30 min.

Mở ống, thêm một lượng magnesi sulfat (5.5) nêu trong Bảng 1 vào ống, đậy nắp ống, lắc ngay trong khoảng 5 s để tránh magnesi sulfat vón cục. Lắc mạnh ống trong khoảng 30 s bằng tay hoặc trong máy lắc cơ học (6.5).

Ly tâm ống ở khoảng 3 000g trong ít nhất 5 min để làm lắng các chất hạt và tách pha.

CHÚ THÍCH Sau khi phân tách pha, thể tích của pha acetonitril (lớp phía trên) xấp xỉ 10,7 mL và chứa xấp xỉ 17 % nước [4].

7.3 Chuẩn bị dung dịch thử mẫu

Sử dụng pipet thích hợp, cho 10 phần thể tích dịch chiết vào lọ (6.8 hoặc 6.10), ngoài ra, thêm 1 phần thể tích dung dịch ISTD hỗn hợp (5.25) và 9 phần thể tích nước (5.1). Trộn bằng máy lắc (6.5) trong ít nhất 5 s.

CHÚ THÍCH 1 Việc lấy các thể tích 200 µl dịch chiết, 20 µl dung dịch ISTD hỗn hợp và 180 µl nước cho thấy hiệu quả tốt.

Dịch chiết cuối cùng có thể bị đục. Dịch chiết đục có thể được bơm mà không ảnh hưởng xấu đến phép phân tích. Trong trường hợp xuất hiện kết tủa thì phải loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc lọc sử dụng lọ lọc (6.10), bộ lọc ly tâm hoặc bộ lọc xyranh (6.9). Trong trường hợp thứ hai, tổng thể tích 400 µL được nêu ở trên có thể quá nhỏ.

CHÚ THÍCH 2 Thành phần dịch chiết cuối cùng là acetonitril đã acid hóa và nước (xấp xỉ 1+1, phần thể tích). Hàm lượng dung môi hữu cơ thấp hơn có thể hạn chế khả năng hòa tan các độc tố vi nấm nồng độ cao hơn trong nước như zearalenon.

7.4 Chuẩn bị mẫu kiểm chứng

Với mỗi mẻ mẫu, sử dụng một mẫu kiểm chứng âm và một mẫu kiểm chứng dương.

Mẫu kiểm chứng âm là mẫu không chứa các độc tố vi nấm đích (không phát hiện được hoặc có nồng độ < 10 % STC), hoặc nếu không có sẵn thì sử dụng mẫu trắng thuốc thử.

Để tạo mẫu trắng thuốc thử, thực hiện chiết (7.2) và các bước tiếp theo mà không cần thêm phần mẫu thử.

Mẫu kiểm chứng dương là mẫu không chứa các độc tố vi nấm đích (không phát hiện được hoặc có nồng độ < 10 % STC) được thêm chuẩn độc tố vi nấm tại STC. Ngoài ra, sử dụng mẫu chuẩn đã biết có chứa độc tố vi nấm đích ở nồng độ gần bằng với STC.

Để chuẩn bị mẫu kiểm chứng dương: thêm chuẩn mẫu không chứa độc tố vi nấm đích bằng cách cho 1,0 mL dung dịch gốc hỗn hợp (5.24) vào mẫu thử không chứa độc tố vi nấm đích.

7.5 Phân tích LC-MS/MS

7.5.1 Yêu cầu chung

Hệ thống LC-MS/MS, thể tích bơm, thành phần pha động và gradient, điều kiện thu nhận và các thông số xử lý dữ liệu phải ở điều kiện sao cho độc tố vi nấm đích được phát hiện ở mức $\leq 25\%$ [giá trị ngưỡng $\times$ STC], với độ chọn lọc đủ để giảm tỷ lệ nghi ngờ sai xuống mức chấp nhận được.

Ví dụ về cài đặt LC-MS/MS được nêu trong Phụ lục A.

7.5.2 Điều kiện LC

Các điều kiện LC phải phù hợp với mục đích sử dụng, nghĩa là đáp ứng được các yêu cầu nêu trong 7.5.1 và 6.11 nhưng tốt nhất là cho kết quả trong thời gian chạy ngắn. Đối với trường hợp thứ hai, việc sử dụng các cột tương đối ngắn (ví dụ: 50 mm) sẽ có lợi.

Thể tích bơm ảnh hưởng đến hình dạng pic của các độc tố vi nấm rửa giải sớm và độ nhạy. Nếu độ nhạy của thiết bị cho phép thì nên bơm các lượng nhỏ (ví dụ: 2 μ L).

7.5.3 Điều kiện MS

Đo một sự chuyển khối là đủ (chọn sự chuyển khối thuận lợi nhất liên quan đến tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N)). Có thể tùy chọn đo nhiều sự chuyển khối. Quá trình chuyển khối thuận lợi nhất có thể khác nhau do các thiết bị và chất rửa giải khác nhau được sử dụng trong LC (ví dụ: các phân tử thêm một proton hoặc các chất cộng hợp natri/amoni trong ESI⁺, các phân tử bị khử proton hoặc các chất cộng hợp

acetat/format trong ESI⁺). Tốt nhất là phát hiện các ion dương và ion âm trong một lần phân tích, nếu thiết bị có khả năng thực hiện được và đạt được đủ độ nhạy khi sử dụng cùng một chất rửa giải. Ngoài ra, cần bơm hai lần, sử dụng hoặc không sử dụng các chất rửa giải khác nhau.

Phương pháp này dựa trên phép nội chuẩn của từng loại độc tố vi nấm dựa vào chất nội chuẩn có gần đồng vị trong cùng một dịch chiết. Để thực hiện việc này, điều cần thiết là sử dụng các chuyển khối tương ứng (cùng chất cộng hợp, cùng một phân mảnh, chỉ khác nhau về đơn vị m/z , theo số lượng nguyên tử ^{13}C).

Trong Phụ lục B, các giá trị m/z của các cặp tiền chất tự nhiên có gần ^{13}C và các ion của sản phẩm tương ứng được đưa ra cho một số chuyển khối thường được sử dụng đối với các độc tố vi nấm trong LC-MS/MS.

Ngoài ra, tất cả các thông số MS cụ thể của chất phân tích, bao gồm cả năng lượng va chạm, phải giống nhau đối với hai lần chuyển khối tương ứng.

7.5.4 Trình tự bơm

Bắt đầu một loạt phép đo bằng cách bơm dung môi [dung dịch chiết (5.22) và nước (1+1, phần thể tích)] để kiểm tra đảm bảo hệ thống không ô nhiễm.

Bơm dung dịch chuẩn hỗn hợp (5.26) để kiểm tra xác nhận việc phát hiện chính xác tất cả các độc tố vi nấm và các chất tương tự có gần đồng vị, sau đó bơm dung môi để kiểm tra khả năng nhiễm từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo. Sau đó bơm mẫu kiểm chứng âm, mẫu kiểm chứng dương và dịch chiết mẫu. Kết thúc trình tự bằng việc bơm một mẫu kiểm chứng dương khác.

7.5.5 Xác định độc tố vi nấm trong dung dịch thử

Xử lý dữ liệu bằng phần mềm tích phân thích hợp. Diện tích pic được sử dụng cho tất cả các phép tính tiếp theo. Kiểm tra sự phân bố và tích phân pic của các chuyển khối đo được và điều chỉnh, nếu cần.

Diện tích pic của độc tố vi nấm và các chất nội chuẩn có gần đồng vị tương ứng của chúng trong dung dịch chuẩn hỗn hợp (5.26) không được chênh lệch quá 30 % khi sử dụng các chuyển khối tương ứng và cài đặt cùng MS [1].

8 Tính kết quả

8.1 Tính tín hiệu tương đối

Tính tín hiệu tương đối của các độc tố vi nấm trong mẫu kiểm chứng và mẫu thử, $RR_{\text{mẫu}}$ so với các chất nội chuẩn có gần đồng vị của chúng, theo Công thức (2):

$$RR_{\text{mẫu}} = \left(\frac{A_{\text{mẫu}}}{A_{\text{IS(STC)}}} \right) \quad (2)$$

Trong đó:

$A_{\text{mẫu}}$ là diện tích pic của độc tố vi nấm trong mẫu thử;

$A_{\text{IS(STC)}}$ là diện tích pic của chất nội chuẩn có gắn đồng vị tại STC trong mẫu thử.

8.2 Phân loại mẫu

Các mẫu được phân loại là âm tính hoặc nghi ngờ dựa trên $RR_{\text{mẫu}}$ và giá trị ngưỡng tại STC được thiết lập trong quá trình nghiên cứu liên phòng thử nghiệm. Dữ liệu ngưỡng được nêu trong Phụ lục C.

Mẫu âm tính khi: $RR_{\text{mẫu}} < \text{giá trị ngưỡng tại STC}$

Mẫu bị nghi ngờ khi: $RR_{\text{mẫu}} \geq \text{giá trị ngưỡng tại STC}$

Kết quả của các mẫu có giá trị khi mẫu kiểm chứng dương bị nghi ngờ và mẫu kiểm chứng âm là âm tính.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải tuân theo TCVN ISO/IEC 17025 và phải chứa ít nhất các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc và ký hiệu mẫu);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và loại quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các kết quả thử nghiệm và các đơn vị biểu thị;
- mọi điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn, có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(tham khảo)

Các điều kiện ví dụ cho hệ thống LC-MS/MS phù hợp

A.1 Ví dụ 1 về cài đặt hệ thống

A.1.1 Điều kiện LC

Hệ thống UHPLC: Acquity UPLC^{® 1)}, (Waters)

Cột: 50 x 2,1 mm, 1,8 µm HSS T3 (Waters)^{®.1)}

Thể tích bơm: 2 µL

Nhiệt độ cột: 40 °C

Tốc độ dòng: 0,40 mL/min

Dung dịch rửa giải A: Nước, chứa acid formic 0,1 % và amoni format 300 mg/L (4,8 mmol/L)

Dung dịch rửa giải B: Methanol, chứa acid formic 0,1 % và amoni format 300 mg/L (4,8 mmol/L)

Bảng A.1 – Thành phần rửa giải

Thời gian min	Dung dịch rửa giải A %	Dung dịch rửa giải B %
0,0	100	0
1,0	100	0
1,5	50	50
3,5	0	100
4,5	0	100
5,0	100	0
6,0	100	0

¹⁾ Acquity UPLC là tên thương mại của sản phẩm do hãng Waters cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không bắt buộc phải sử dụng sản phẩm nêu trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

A.1.2 Điều kiện MS

Hệ thống MS: 6500 Qtrap (AB Sciex)²⁾

Việc thu nhận được thực hiện bằng cách đo luân phiên các ion dương và âm.

Cài đặt chung:

	Thử nghiệm 1	Thử nghiệm 2
	ESI ⁺	ESI ⁻
Kiểu quét	MRM	MRM
Chương trình MRM	Không	Không
Độ phân cực	Dương tính	Âm tính
Độ phân giải Q1	Đơn vị	Đơn vị
Độ phân giải Q3	Đơn vị	Đơn vị
Ngưỡng cường độ	0 chu kỳ mỗi giây	0 chu kỳ mỗi giây
Thời gian cài đặt	30 ms	30 ms
Chế độ dừng MR	5 ms	5 ms
MCA	Không	Không
Cỡ bước	0 Da	0 Da
Khí chần (CUR)	40	40
Khí va chạm (CAD)	Trung bình	Trung bình
Nhiệt độ (TEM)	400	400
Nguồn khí ion 1 (GS1)	50	50
Nguồn khí ion 2 (GS2)	50	50
Điện áp phun ion (IS)	4000	-4000
Điện thế đầu vào (EP)	10	-10
Thời gian dừng cho tất cả các chuyển khối	5 ms	5 ms

²⁾ 6500 Qtrap® là tên thương mại của một sản phẩm do AB Sciex cung cấp. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không bắt buộc phải sử dụng sản phẩm trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu chúng cho kết quả tương đương.

A.1.3 Điều kiện LC-MS/MS

Bảng A.2 – Cài đặt cụ thể chất phân tích và thời gian lưu

Độc tố vi nấm	RT min	Phân cực	Ion mẹ	Tiền chất <i>m/z</i>	Sản phẩm <i>m/z</i>	DP ^a	CE ^a	CXP ^a
Aflatoxin B ₁	2,45	Dương	M+H	313,1	285,1	40	33	16
Aflatoxin B ₁ [¹³ C ₁₇]	2,45	Dương	M+H	330,1	301,1	40	33	16
Deoxynivalenol	2,09	Dương	M+H	297,1	249,1	30	15	15
Deoxynivalenol [¹³ C ₁₅]	2,09	Dương	M+H	312,2	263,2	30	15	15
Fumonisin B ₁	2,55	Dương	M+H	722,4	334,3	40	57	4
Fumonisin B ₁ [¹³ C ₃₄]	2,55	Dương	M+H	756,5	356,4	40	57	4
Fumonisin B ₂	2,82	Dương	M+H	706,4	336,3	40	53	8
Fumonisin B ₂ [¹³ C ₃₄]	2,82	Dương	M+H	740,5	358,4	40	53	8
HT-2 toxin	2,63	Dương	M+ NH ₄	442,2	263,1	40	19	6
HT-2 toxin [¹³ C ₂₂]	2,63	Dương	M+ NH ₄	464,3	278,2	40	19	6
Ochratoxin A	2,86	Dương	M+ H	404,1	239,0	40	33	16
Ochratoxin A [¹³ C ₂₀]	2,86	Dương	M+H	424,2	250,0	40	33	16
T-2 toxin	2,77	Dương	M+ NH ₄	484,3	215,1	40	25	18
T-2 toxin [¹³ C ₂₄]	2,77	Dương	M+ NH ₄	508,3	229,2	40	25	18
Zearalenon	2,90	Âm	M-H	317,1	175,0	-175	-32	-15
Zearalenon [¹³ C ₁₈]	2,90	Âm	M-H	335,2	185,1	-175	-32	-15

^a CHÚ DẪN

DP: Điện thế tách cụm

CE: Năng lượng va chạm

CXP: Điện thế đầu ra của buồng va chạm

A.2 Ví dụ 2 về cài đặt hệ thống

A.2.1 Điều kiện LC

Hệ thống UHPLC: Agilent 1290 UPLC[®],³⁾

Cột: 100 x 2 mm, 2,7 µm NUCLEOSHELL[®],³⁾ RP18 plus (Macherey Nagel)

Thể tích bơm: 10 µL

Nhiệt độ cột: 30 °C

Tốc độ dòng: 0,40 ml/min

Dung dịch rửa giải A: Nước, chứa acid formic 0,1% và amoni format 5 mmol/L

Dung dịch rửa giải B: Methanol, chứa acid formic 0,1 % và amoni format 5 mmol/L

Bảng A.3 – Thành phần rửa giải

Thời gian min	Dung dịch rửa giải A %	Dung dịch rửa giải B %
0,0	95	5
1,0	95	5
1,5	50	50
5,0	5	95
6,0	5	95
6,1	95	5
7,5	95	5

A.2.2 Điều kiện MS

Hệ thống MS: Agilent 6490 MS-MS[®],³⁾

Cài đặt chung:

Nguồn: ESI

³⁾ Agilent 1290 UPLC và Agilent 6490 MS-MS là tên thương mại của sản phẩm do Agilent cung cấp và NUCLEOSHELL[®] là tên thương mại của sản phẩm do Macherey Nagel cung cấp. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo sự thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không bắt buộc phải sử dụng sản phẩm trên. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Nhiệt độ khí:	200 °C
Lưu lượng khí:	18 L/min
Ống phun sương:	25 psi
nhiệt độ khí bay hơi:	350 °C
dòng khí bay hơi:	11 L/min
mao quản ESP ⁺ :	4000 V
mao quản ESP ⁻ :	3000 V
Bộ phân mảnh:	380 V
Điện thế gia tốc:	4 V

A.2.3 Điều kiện LC-MS/MS

Bảng A.4 – Cài đặt cụ thể của chất phân tích và thời gian lưu

Độc tố vi nấm	RT min	Phân cực	Tiền chất	Ion mẹ	Ion sản phẩm 1	CE1	Ion sản phẩm 2	CE 2
Aflatoxin B ₁	3,05	Dương	M+H	313,1	241	41	285	21
Aflatoxin B ₁ [¹³ C ₁₇]	3,05	Dương	M+H	330,1	255,1	41	301,1	21
Deoxynivalenol	2,29	Dương	M+H	297,3	203,2	13	249	9
Deoxynivalenol [¹³ C ₁₅]	2,29	Dương	M+H	312,2	263,1	9	216,1	13
Fumonisin B ₁	3,66	Dương	M+H	722,8	352,3	37	334,4	49
Fumonisin B ₁ [¹³ C ₃₄]	3,66	Dương	M+H	756,5	374,4	40		
Furmonisin B ₂	4,35	Dương	M+H	706,8	336,3	41	318,4	41
Furmonisin B ₂ [¹³ C ₃₄]	4,35	Dương	M+H	740,5	358,4	40		
HT-2 toxin	3,55	Dương	M+NH ₄	442,5	263,2	9	215	13
HT-2 toxin [¹³ C ₂₂]	3,55	Dương	M+NH ₄	464,3	278,1	9	229,2	9
Ochratoxin A	4,20	Dương	M+H	404,1	238,9	21	221	41
Ochratoxin A [¹³ C ₂₀]	4,20	Dương	M+H	424,2	250,1	29	232,1	41
T-2 toxin	3,89	Dương	M+NH ₄	484,5	305	8	215,1	17
T-2 toxin [¹³ C ₂₄]	3,89	Dương	M+NH ₄	508,3	322,1	8	229,1	17
Zearalenon	4,23	Âm	M-H	317,3	175	-25	131,1	-33
Zearalenon [¹³ C ₁₈]	4,23	Âm	M-H	335,2	185,1	-25	140	-33

Phụ lục B
(tham khảo)

Các cặp tiền chất và ion sản phẩm tự nhiên và có gắn ¹³C tương ứng
đối với một số chuyển khối thường được sử dụng

Trong phương pháp này, các độc tố vi nấm có gắn ¹³C thống nhất được sử dụng làm chất nội chuẩn. Đối với các độc tố vi nấm có gắn ¹³C, quá trình chuyển khối phải tương ứng với quá trình chuyển khối của các độc tố vi nấm tự nhiên, nghĩa là ion mẹ và ion sản phẩm được sử dụng cho độc tố vi nấm tự nhiên và độc tố vi nấm có gắn đồng vị là giống nhau (cùng chất cộng hợp, cùng một phân mảnh, chỉ khác đơn vị m/z do số lượng nguyên tử ¹³C). Trong Bảng B.1, các chuyển khối tương ứng được đưa ra đối với nhiều chuyển khối thường được sử dụng.

Bảng B.1 – Phép đo dưới dạng ion dương (ESI⁺)

Độc tố vi nấm	Công thức phân tử	Ion mẹ		Ion sản phẩm	
		Tự nhiên	Có gắn ¹³ C	Tự nhiên	Có gắn ¹³ C
Aflatoxin B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆				
	[M+H]	313,1	330,1		
	C ₁₆ H ₁₃ O ₅			285,1	301,1
	C ₁₄ H ₉ O ₄			241,0	255,1
	C ₁₃ H ₉ O ₃			213,1	226,1
	C ₁₂ H ₉ O ₂			185,1	197,1
Deoxynivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆				
	[M+H]	297,1	312,2		
	C ₁₄ H ₁₇ O ₄			249,1	263,2
	C ₁₄ H ₁₅ O ₃			231,1	245,1
	C ₁₃ H ₁₅ O ₂			203,1	216,2
	C ₁₁ H ₁₁ O ₂			175,1	186,1
	C ₁₂ H ₁₃ O ₂			189,1	201,1
	C ₁₅ H ₁₉ O ₅			279,1	294,2
Fumonisin B ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅				
	[M+H]	722,4	756,5		

Bảng B.1 (tiếp theo)

Độc tố vi nấm	Công thức phân tử	Ion mẹ		Ion sản phẩm	
		Tự nhiên	Có gắn ^{13}C	Tự nhiên	Có gắn ^{13}C
	$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{NO}_2$			352,3	374,4
	$\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{NO}$			334,3	356,4
Fumonisin B ₂	$\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$				
	[M+H]	706,4	740,5		
	$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{NO}$			336,3	358,4
	$\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}$			318,3	340,4
HT-2 toxin	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_8$				
	[M+H]	425,2	447,3		
	[M+NH ₄]	442,2	464,3		
	$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4$			263,1	278,2
	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_2$			215,1	229,2
	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}$			173,1	185,1
HT-2 toxin ^a	[M+Na]	447,2	469,3		
	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$			345,1	362,2
	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}$			285,1	300,2
Ochratoxin A	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$				
	[M+H]	404,1	424,2		
	$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_4\text{Cl}$			239,0	250,0
	C_8H_6			102,0	110,1
T-2 toxin	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_9$				
	[M+H]	467,2	491,3		
	[M+NH ₄]	484,3	508,3		
	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_2$			215,1	229,2
	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}$			185,1	198,1
	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_5$			305,1	322,2
	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_3$			245,1	260,2

Bảng B.1 (kết thúc)

Độc tố vi nấm	Công thức phân tử	Ion mẹ		Ion sản phẩm	
		Tự nhiên	Có gắn ¹³ C	Tự nhiên	Có gắn ¹³ C
T-2 toxin ^a	[M+Na]	489,2	513,3		
	C ₁₇ H ₂₀ O ₅ Na			327,1	344,2
	C ₁₇ H ₂₂ O ₆ Na			345,1	362,2
Zearalenon	C ₁₈ H ₂₂ O ₅				
	[M+H]	319,2	337,2		
	C ₁₂ H ₁₁ O ₂			187,1	199,1
	C ₁₈ H ₁₉ O ₃			283,1	301,2
^a Các ion mẹ/sản phẩm thay thế.					

Bảng B.2 – Đo theo chế độ ion âm (ESI⁻)

Độc tố vi nấm	Công thức phân tử	Ion mẹ		Ion sản phẩm	
		Tự nhiên	Có gắn ¹³ C	Tự nhiên	Có gắn ¹³ C
Deoxynivalenol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆				
	[M-H]	295,1	310,2		
	C ₁₄ H ₁₇ O ₅			265,1	279,2
	C ₁₄ H ₁₅ O ₄			247,1	261,1
Deoxynivalenol ^a	[M+acetat]	355,1	370,2		
	C ₁₅ H ₁₉ O ₆			295,1	310,2
	C ₁₄ H ₁₇ O ₅			265,1	279,2
	C ₂ H ₃ O ₂ ^b			59,0 ^b	59,0 ^b
Zearalenon	C ₁₈ H ₂₂ O ₅				
	[M-H]	317,1	335,2		
	C ₉ H ₇ O			131,1	140,1
	C ₁₀ H ₇ O ₃			175,0	185,1
	C ₁₇ H ₂₁ O ₃			273,1	290,2
^a Các ion mẹ/sản phẩm thay thế trong trường hợp dung dịch rửa giải chứa acetat.					
^b Việc đo acetat dưới dạng ion sản phẩm có thể không đặc hiệu và do đó không được khuyến cáo.					

Phụ lục C

(tham khảo)

Dữ liệu độ chum

Phương pháp này được xây dựng bởi RIKILT - Đại học Wageningen và Nghiên cứu, cộng tác với Eurofins[WE]-Contaminant và đã được thử nghiệm vào năm 2016 trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm với 14 phòng tham gia, sử dụng mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn và mẫu ngũ cốc/sản phẩm ngũ cốc, quả và tây, lạc và nước nho bị nhiễm tự nhiên, dựa trên Quy định của Ủy ban châu Âu (EU) 519/2014 [3] và Hướng dẫn của AOAC về quy trình nghiên cứu cộng tác [5] trong khuôn khổ CEN Mandate M/520.

Dữ liệu nêu trong Bảng C.1 đến Bảng C.8 thu được trong phép thử liên phòng thử nghiệm này. Các giá trị ngưỡng đã được xác định theo 4.3.2.4 của Tài liệu tham khảo [3], xem Công thức (C.1):

$$\text{Giá trị ngưỡng tại } STC = RR_{STC} - \text{giá trị } t_{0,05} \times SD_{STC} \quad (1)$$

Trong đó:

RR_{STC} : là tín hiệu tương đối trung bình của các mẫu chứa độc tố vi nấm tại STC ;

Giá trị- $t_{0,05}$: là giá trị t một phía cho tỷ lệ kết quả âm tính giả là 5 % (bảng 1,7 khi $n = 20$, xem Bảng B [3]);

SD_{STC} : là độ lệch chuẩn thu được đối với tín hiệu tương đối của các mẫu chứa độc tố vi nấm tại STC .

Bảng C.1 – Dữ liệu độ chụm và giá trị ngưỡng đối với aflatoxin B₁

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phân khối lượng, tính bằng µg/kg	nd ^a	2,0 ^b	5,1 ^a	nd ^a	2,0 ^b	3,0 ^a	nd ^a	2,0 ^b	0,5 ^a	nd ^a	2,0 ^b	4,9 ^a	nd ^a	2,0 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Số kết quả được chấp nhận	26	26	26	26	26	26	26	26	18	26	22	24	26	26
Trung bình $RR_{STC} = 2 \text{ µg/kg}$		0,955			0,908			0,967			0,914			0,939
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,000		2,55	0,007		1,45	0,012		0,247	0,000		2,11	0,004	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		25	20		18	26		27	34		24	17		16
Giá trị ngưỡng RR ở phân khối lượng được quy định ở trên		0,542	0,655		0,636	0,539		0,520	0,409		0,548	0,619		0,680
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		3,8	0,0		0,0	0,0		3,8			4,5	0,0		3,8
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0			0,0			0,0		0,0	0,0			0,0	

^a nd = không phát hiện được pic (< 0,3 µg/kg). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, sử dụng giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng < STC , nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

Bảng C.2 – Dữ liệu về độ chụm và giá trị ngưỡng của deoxynivalenol

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phần khối lượng, tính bằng $\mu\text{g/kg}$	nd ^a	250 ^b	865 ^a	nd ^a	250 ^b	588 ^a	nd ^a	250 ^b	nd ^a	nd ^a	250 ^b	nd ^a	nd ^a	250 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Số kết quả được chấp nhận	22	22	22	22	22	22	22	20	22	22	20	22	22	22
Trung bình $RR_{STC} = 250 \mu\text{g/kg}$		0,897			1,022			0,955			0,850			0,925
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,062		3,28	0,137		2,26	0,268		0,330	0,032		0,027	0,038	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		11	8		18	12		15			35			12
Giá trị ngưỡng RR ở phần khối lượng được quy định ở trên		0,737	0,819		0,718	0,757		0,712			0,348			0,741
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		4,5	0,0		0,0	0,0		0,0			10			0,0
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0			0,0			9,1		18	4,5		0,0	0,0	

^a nd = không phát hiện được pic ($<20 \mu\text{g/kg}$). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng $< STC$, nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

^d Một phòng thử nghiệm thực hiện ba phép đo bằng các thiết bị khác nhau.

Bảng C.3 – Dữ liệu về độ chụm và giá trị ngưỡng của fumonisin B₁

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phần khối lượng, tính bằng µg/kg	nd ^a	350 ^b	786 ^a	nd ^a	350 ^b	647 ^a	206 ^a	556 ^{b,d}	50 ^a	13 ^a	350 ^b	nd ^a	nd ^a	350 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Số kết quả được chấp nhận	18	18	18	18	18	18	18	17	16	12	17	18	18	18
Trung bình $RR_{STC} = 350 \text{ µg/kg}$		0,539			0,649			d			0,608			0,784
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,007		1,14	0,040		2,08	0,580	1,38	0,111	0,037		0,011	0,003	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		23	25		23	36	33	19	35	54	25			17
Giá trị ngưỡng RR ở phần khối lượng được quy định ở trên		0,326	0,289		0,399	0,444	0,435	0,593	0,317	< LOD	0,351			0,556
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		0,0	0,0		0,0	5,6		5,9 ^d			5,9			5,6
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0			5,6			5,6 ^d		0,0	0,0			0,0	
^a nd = không phát hiện được pic (<7 µg/kg). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn. ^b thêm chuẩn tại STC. ^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng $< STC$, nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$. ^d Phần khối lượng, âm tính giả và nghi ngờ giả ở mức 556 µg/kg (phát sinh + STC) thay vì STC.														

Bảng C.4 – Dữ liệu về độ chụm và giá trị ngưỡng của fumonisin B₂

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phần khối lượng, tính bằng µg/kg	nd ^a	200 ^b	110 ^a	nd ^a	200 ^b	234 ^a	nd ^a	200 ^b	nd ^a	nd ^a	200 ^b	nd ^a	nd ^a	200 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Số kết quả được chấp nhận	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Trung bình $RR_{STC} = 200 \mu\text{g/kg}$		0,762			0,846			1,14			0,729			0,929
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,052		0,547	0,017		1,16	0,173		0,070	0,012		0,010	0,004	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		31	32		29	35	43	26			35			29
Giá trị ngưỡng RR ở phần khối lượng được quy định ở trên		0,359	0,456		0,425	0,402	0,595	0,635			0,299			0,466
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		0,0			0,0	0,0		0,0			4,2			0,0
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0		95,8	0,0			0,0		0,0	0,0		0,0	0,0	

^a nd = không phát hiện được pic (<9 µg/kg). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng $< STC$, nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

^d Một phòng thử nghiệm thực hiện ba phép đo bằng các thiết bị khác nhau, trong đó một phép đo bị loại bỏ.

Bảng C.5 – Dữ liệu về độ chụm và giá trị ngưỡng của ochratoxin A

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phân khối lượng tính bằng µg/kg	nd ^a	5,0 ^b	4,5 ^a	nd ^a	5,0 ^b	3,7 ^a	nd ^a	5,0 ^b	8,9 ^b	nd ^a	5,0 ^b	nd ^a	0,6 ^a	5,0 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Số kết quả được chấp nhận	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	21	22
Trung bình $RR_{STC} = 5,0 \text{ µg/kg}$		0,891			0,875			0,915			0,812			0,997
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,050		0,936	0,001		0,744	0,000		1,677	0,002		0,000	0,144	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		15	14		16	18		10	17		19		28	16
Giá trị ngưỡng RR ở phân khối lượng được quy định ở trên		0,669	0,800		0,631	0,692		0,758	0,678		0,551		0,542	0,722
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		4,5			0,0			0,0	0,0		0,0			0,0
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0		100	0,0		73	0,0			0,0		0,0	0,0	

^a nd = không phát hiện được pic (< 0,4 µg/kg). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng < STC , nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

Bảng C.6 – Dữ liệu độ chụm và giá trị ngưỡng của T-2 toxin

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phần khối lượng, tính bằng $\mu\text{g/kg}$	nd ^a	25 ^b	23 ^a	nd ^a	25 ^b	22 ^a	nd ^a	25 ^b	nd ^a	8,0 ^a	33 ^{b,d}	nd ^a	nd ^a	25 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Số kết quả được chấp nhận	26	26	25	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
Trung bình $RR_{STC} = 25 \mu\text{g/kg}$		1,004			0,986			0,988			d			0,953
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,015		0,731	0,003		0,798	0,001		0,000	0,301	1,259	0,005	0,001	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		26	27		22	29		27		33	23			23
Giá trị ngưỡng RR ở phần khối lượng được quy định ở trên		0,568	0,425		0,612	0,452		0,540		0,407	0,776			0,573
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		0,0			0,0			7,7			0,0 ^d			0,0
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0		72	0,0		85	0,0		0,0	0,0		0,0	0,0	

^a nd = không phát hiện được pic ($< 0,4 \mu\text{g/kg}$). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng $< STC$, nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

^d Phần khối lượng, âm tính giả và nghi ngờ giả ở mức $33 \mu\text{g/kg}$ (phát sinh + STC) thay vì STC .

Bảng C.7 – Dữ liệu độ chụm và giá trị ngưỡng của HT-2 toxin

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phần khối lượng, tính bằng µg/kg	nd ^a	25 ^b	44 ^a	nd ^a	25 ^b	49 ^a	nd ^a	25 ^b	nd ^a	nd ^a	25 ^b	nd ^a	nd ^a	25 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Số kết quả được chấp nhận	22	22	22	22	22	22	22	22	21	22	22	22	22	22
Trung bình $RR_{STC} = 25 \text{ µg/kg}$		1,098			0,904			0,927			1,087			0,886
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,070		1,752	0,004		1,686	0,000		0,040	0,155		0,025	0,000	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		22	18		24	24		23			39			21
Giá trị ngưỡng RR ở phần khối lượng được quy định ở trên		0,696	0,686		0,535	0,514		0,566			0,362			0,564
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		0,0	0,0		18	0,0		4,5			0,0			0,0
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0			0,0			0,0		0,0	9,1		4,5	0,0	

^a nd = không phát hiện được pic (< 3 µg/kg). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng < STC , nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

Bảng C.8 – Dữ liệu về độ chụm và giá trị ngưỡng của zearalenon

Thông số	Lúa mì		Hỗn hợp ngũ cốc		Bột mì		Ngô mảnh		Quả và tây		Lạc		Nước nho	
Phần khối lượng, tính bằng $\mu\text{g/kg}$	nd ^a	30 ^b	101 ^a	nd ^a	30 ^b	81 ^a	nd ^a	30 ^b	nd ^a	nd ^a	30 ^b	nd ^a	nd ^a	30 ^b
Số phòng thử nghiệm tham gia	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả phù hợp	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Số kết quả được chấp nhận	22	21	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
Trung bình $RR_{STC} = 30 \mu\text{g/kg}$		1,035			1,046			1,048			1,086			1,001
Trung bình $RR_{mẫu}$ (mẫu trắng hoặc bị nhiễm)	0,018		3,023	0,014		2,283	0,000		0,000	0,008		0,000	0,001	
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R		20	20		20	20		15			42			16
Giá trị ngưỡng RR ở phần khối lượng được quy định ở trên		0,691	0,592		0,697	0,554		0,776			0,311			0,726
Phần trăm âm tính giả tại STC ($RR < \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c		0,0	0,0		0,0	0,0		0,0			0,0			4,5
Phần trăm nghi ngờ giả tại STC ($RR \geq \text{giá trị ngưỡng } STC$) ^c	0,0			0,0			0,0		0,0	0,0		0,0	0,0	

^a nd = không phát hiện được pic ($< 4 \mu\text{g/kg}$). Được xác định bằng cách phân tích định lượng các mẫu không thêm chuẩn.

^b thêm chuẩn tại STC .

^c Đối với ngũ cốc, giá trị ngưỡng của lúa mì được sử dụng, đối với các nền mẫu khác, giá trị ngưỡng của nền mẫu tương ứng được sử dụng. Âm tính giả = giá trị định lượng $\geq STC$, nhưng $RR < \text{giá trị ngưỡng}$; nghi ngờ giả = giá trị định lượng $< STC$, nhưng $RR > \text{giá trị ngưỡng}$.

^d Một phòng thử nghiệm thực hiện hai phép đo, sử dụng các thiết bị khác nhau.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed
 - [2] Regulation EC No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council, *Official Journal of the European Union* Corrigendum in I, 136/3 of 29 May 2007, in its current (consolidated) version
 - [3] Commission Regulation (EU) No 519/2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. *Official Journal of the European Union*, L147/29
 - [4] Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenk F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 2003, 86 pp. 412-431
 - [5] AOAC. 2002. AOAC Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis Appendix D
-