

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 14439:2025

BS EN 17521:2021

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH ĐỘC TỐ ALTERNARIA
TRONG CÀ CHUA, LÚA MÌ VÀ HẠT HƯỚNG DƯƠNG
BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÀM SẠCH SỬ DỤNG CỘT CHIẾT
PHA RẮN (SPE) VÀ SẮC KÝ LÒNG HIỆU NĂNG CAO-
HAI LẦN KHỐI PHỔ (HPLC MS/MS)**

*Foodstuffs – Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and
sunflower seeds by SPE clean-up and HPLC-MS/MS*

HÀ NỘI – 2025

Lời nói đầu

TCVN 14439:2025 hoàn toàn tương đương với BS EN 17521:2021;

TCVN 14439:2025 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

Các loài *Alternaria*, phổ biến nhất là *A. alternata*, tạo ra hơn 70 chất chuyển hóa thứ cấp, nhưng chỉ một số ít trong số xác định được cấu trúc và được báo cáo là độc tố nấm mốc [1]. Nấm *Alternaria* là sinh vật gây hại thực vật phổ biến trong ngũ cốc, hạt có dầu, rau quả và sự hiện diện của các độc tố *Alternaria* trong các mặt hàng này đã được ghi nhận rộng rãi [1]. Những chất độc này không chỉ làm ô nhiễm nông sản được thu hoạch mà còn có thể làm hỏng thực phẩm được bảo quản.

Trong số các độc tố *Alternaria* này, altenuene (ALT), alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), tentoxin (TEN) và acid tenuazonic (TEA) là những chất được quan tâm chính. ALT, AOH, AME là các dibenzo- α -pyron, TEN là một tetrapeptide tuần hoàn và TEA là một dẫn xuất của acid tetramic. ALT và TEA đã cho thấy độc tính cấp tính cao trong ống nghiệm và trong các thử nghiệm trên động vật. AME và AOH ít độc hại hơn; tuy nhiên, chúng đã được mô tả là gây ra tác dụng gây độc gen và gây đột biến [1 - 3].

Những chất độc này thường xuất hiện trong các sản phẩm cà chua, ngũ cốc và hạt có dầu (ví dụ như hạt hướng dương), do đó chúng là trọng tâm trong tiêu chuẩn này.

CẢNH BÁO 1 – Cần thực hiện 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.

CẢNH BÁO 3 – Một số chất độc của *Alternaria* thể hiện tác dụng gây độc gen và gây đột biến.

Thực phẩm – Xác định độc tố *Alternaria* trong cà chua, lúa mì và hạt hướng dương bằng phương pháp làm sạch sử dụng cột chiết pha rắn (SPE) và sắc ký lỏng hiệu năng cao-hai lần khối phổ (HPLC MS/MS)

Foodstuffs – Determination of Alternaria toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE clean-up and HPLCMS/MS

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình xác định năm độc tố *Alternaria* trong lúa mì, puree cà chua và hạt hướng dương bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) kết hợp với phép đo hai lần khối phổ (MS/MS).

Phương pháp này đã được xác nhận giá trị sử dụng với các mẫu lúa mì, puree cà chua và hạt hướng dương, cả mẫu bị ô nhiễm tự nhiên và mẫu thêm chuẩn.

Mức xác nhận giá trị sử dụng đối với altenuene (ALT) nằm trong khoảng từ 2,18 µg/kg đến 13,8 µg/kg.

Mức xác nhận giá trị sử dụng đối với alternariol (AOH) nằm trong khoảng từ 1,82 µg/kg đến 46,7 µg/kg.

Mức xác nhận giá trị sử dụng đối với alternariol monomethyl ether (AME) nằm trong khoảng từ 1,29 µg/kg đến 47,2 µg/kg.

Mức xác nhận giá trị sử dụng đối với tentoxin (TEN) nằm trong khoảng từ 5,29 µg/kg đến 218 µg/kg.

Các mức xác nhận giá trị sử dụng đối với acid tenuazonic (TEA) nằm trong khoảng từ 41,8 µg/kg đến 1 618 µg/kg.

Giới hạn định lượng của phương pháp này là 1 µg/kg đối với ALT (riêng lúa mì và hạt hướng dương là 1,4 µg/kg và 1,2 µg/kg), AOH và AME; có thể đạt được 5 µg/kg đối với TEN và 10 µg/kg đối với TEA hoặc thấp hơn.

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 (ISO 3696), *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

Phần mẫu thử đã thêm chất nội chuẩn có gắn đồng vị được chiết bằng hỗn hợp của methanol, nước và acid acetic. Hỗn hợp mẫu/dung môi chiết được ly tâm và thu lấy phần dịch nổi phía trên. Dịch chiết được pha loãng với một thể tích tương đương dung dịch acid acetic 1 % (φ) và được làm giàu trên chất hấp phụ polyme chiết pha rắn (SPE). Dịch chiết được rửa giải ra khỏi cột SPE bằng dung dịch methanol và ethyl acetat. Dịch rửa giải được làm bay hơi, hoà tan trở lại, lọc qua bộ lọc xyranh polytetrafluoroethylene (PTFE) và sau đó được phân tích bằng HPLC-MS/MS.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước phù hợp với loại 1 của TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Dung dịch phải đạt chất lượng để phân tích LC-MS, trừ khi có quy định khác. Có thể sử dụng các dung dịch bán sẵn trên thị trường với các đặc tính tương đương với các dung dịch được liệt kê.

5.1 Khí nén nitơ, độ tinh khiết tương đương $\varphi = 99,99$ % hoặc cao hơn.

5.2 Nước (H_2O), loại dùng cho HPLC.

5.3 Nước (H_2O), loại dùng cho LC-MS.

5.4 Methanol (CH_3OH), tinh khiết phân tích.

5.5 Methanol (CH_3OH), loại dùng cho LC-MS.

5.6 Ethyl acetat ($CH_3COOC_2H_5$), tinh khiết phân tích hoặc cao hơn.

5.7 Amoni hydroxide (NH_4OH), loại dùng cho LC-MS, phần khối lượng $w(NH_4OH) = 25$ %.

5.8 Amoni hydroxide (NH_4OH), $w(NH_4OH) = 2,3$ %.

Cho 1 mL amoni hydroxide 25 % (5.7) vào bình định mức 10 mL chứa khoảng 5 mL nước (5.3) và

thêm nước (5.3) đến vạch.

5.9 Acid acetic (CH_3COOH), $w \geq 99,7 \%$.

5.10 Amoni acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), loại LC-MS.

5.11 Dung dịch amoni acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), nồng độ mol $c = 1 \text{ mol/L}$.

Hòa tan 77,08 g amoni acetat (5.10) trong 1 L nước (5.3).

5.12 Hỗn hợp chiết, hỗn hợp methanol + nước + acid acetic (85 + 14 + 1, phần thể tích).

Trộn 850 mL methanol (5.4) với 140 mL nước (5.2) và 10 mL acid acetic (5.9).

5.13 Dung dịch acid acetic, acid acetic + nước (1 + 99, phần thể tích), $\varphi = 1 \%$.

Trộn 10 mL acid acetic (5.9) với 990 mL nước (5.2) và trộn đều.

5.14 Dung dịch rửa giải, methanol + ethyl acetat (75 + 25, phần thể tích).

Trộn 750 mL methanol (5.4) với 250 mL ethyl acetat (5.6) và trộn đều.

5.15 Pha động HPLC A, dung dịch đệm amoni acetat 5 mmol/L ở pH xấp xỉ 8,0.

Trộn 5 mL dung dịch amoni acetat (5.11) và khoảng 200 μL amoni hydroxide 2,3 % (5.8) với 900 mL nước (5.3). Chỉnh thể tích bằng nước (5.3) đến 1 L và trộn đều.

Kiểm tra độ pH của pha động A. Giá trị pH phải nằm trong khoảng từ 7,95 đến 8,05. Chỉnh pH bằng amoni hydroxide 2,3 % (5.8) để giá trị pH nằm trong khoảng nêu trên.

5.16 HPLC pha động B, methanol (5.5).

5.17 Các chất chuẩn của độc tố *Alternaria*, ví dụ ở dạng tinh thể, dưới dạng màng hoặc làm vật liệu chuẩn.

5.17.1 Altenuen, độ tinh khiết ít nhất $w = 96 \%$.

5.17.2 Alternariol, độ tinh khiết ít nhất $w = 96 \%$.

5.17.3 Alternariol monomethyl ether, độ tinh khiết ít nhất $w = 96 \%$.

5.17.4 Tentoxin, độ tinh khiết ít nhất $w = 96 \%$.

5.17.5 Acid tenuazonic, độ tinh khiết ít nhất $w = 96 \%$.

Các phòng thử nghiệm có thể tìm kiếm độ tinh khiết cao hơn, nếu có sẵn trên thị trường.

5.18 Các chất nội chuẩn có gắn đồng vị, ví dụ dạng tinh thể hoặc dung dịch chuẩn.

5.18.1 Chất nội chuẩn có gắn đồng vị altenuene (ALT-ISTD), ví dụ ALT-(methoxy-d₃, methyl-d₃) (ALT-d₆).

5.18.2 Chất nội chuẩn có gắn đồng vị của alternariol (AOH-ISTD), ví dụ AOH-(methyl-d₃) (AOH-d₃).

5.18.3 Chất nội chuẩn có gắn đồng vị (AME-ISTD) của alternariol monomethyl ether, ví dụ AME-(1-methyl-d₃) (AME-d₃).

5.18.4 Chất nội chuẩn có gắn đồng vị tentoxin (TEN-ISTD), ví dụ TEN-d₃.

5.18.5 Chất nội chuẩn có gắn đồng vị của acid tenuazonic (TEA-ISTD), ví dụ TEA-(acetyl-¹³C₂) (TEA-¹³C₂), hỗn hợp các đồng phân không đối quang trong methanol.

Các phòng thử nghiệm có thể tìm kiếm các chất nội chuẩn có gắn đồng vị với mức độ khử màu hoặc làm giàu ¹³C cao.

CẢNH BÁO – Phải luôn mặc quần áo bảo hộ, đeo găng tay và mang kính bảo hộ, tất cả các giai đoạn chuẩn bị mẫu và chất chuẩn phải được thực hiện trong tủ hút.

5.19 Dung dịch gốc chứa ALT, AOH, AME, TEN và TEA, ví dụ ở nồng độ khối lượng $\rho = 100 \mu\text{g/mL}$.

Trong trường hợp dạng bột kết tinh, cân, ví dụ 5 mg ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3), TEN (5.17.4) và TEA (5.17.5), chính xác đến 0,1 mg, cho vào từng bình định mức 50 mL riêng rẽ và thêm methanol (5.5) đến vạch. Đồng hóa mạnh.

Trong trường hợp dạng màng khô, pha lại chất chuẩn trong lọ theo chứng nhận của từng chất chuẩn.

Các dung dịch gốc bền trong ít nhất sáu tháng nếu được bảo quản ở $\leq -18^\circ\text{C}$.

CHÚ THÍCH Để kiểm tra xác nhận nồng độ của các chất chuẩn được chuẩn bị bằng phương pháp đo khối lượng sử dụng phép đo quang, các hệ số tắt mol sẵn có được nêu trong tài liệu về AOH [5], AME [5], ALT [6], TEN [7] và TEA [8].

5.20 Dung dịch chuẩn 1

Chuẩn bị hỗn hợp chuẩn trong methanol có chứa ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3) ở nồng độ 500 ng/mL, TEN (5.17.4) ở nồng độ 2 500 ng/mL và TEA (5.17.5) ở nồng độ 5 000 ng/mL.

Để thực hiện, chuyển 25 μL dung dịch gốc ALT, AOH và AME (5.19) vào bình định mức 5 mL. Chuyển, ví dụ 125 μL dung dịch gốc TEN (5.19) và 250 μL dung dịch gốc TEA (5.19) vào cùng một bình định mức 5 mL. Thêm methanol (5.5) đến vạch. Đồng hóa mạnh. Dung dịch chuẩn 1 bền trong ít nhất sáu tháng nếu được bảo quản ở $\leq -18^\circ\text{C}$.

CHÚ THÍCH Thê tích chính xác được sử dụng để chuẩn bị dung dịch chuẩn 1 (5.20) được lấy từ nồng độ chính xác của dung dịch gốc (5.19).

5.21 Dung dịch chuẩn 2

Chuẩn bị hỗn hợp chuẩn trong methanol có chứa ALT (5.17.1), AOH (5.17.2), AME (5.17.3) ở nồng độ 100 ng/mL, TEN (5.17.4) ở nồng độ 500 ng/mL và TEA (5.17.5) ở nồng độ 1 000 ng/mL. Dung dịch chuẩn 2 được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn 1 (5.20).

Chuyển 1 000 μL dung dịch chuẩn 1 (5.20) vào bình định mức 5 mL. Thêm methanol (5.5) đến vạch. Đồng hóa mạnh. Dung dịch chuẩn 2 bền trong ít nhất sáu tháng nếu được bảo quản ở $\leq -18^\circ\text{C}$.

5.22 Dung dịch gốc ALT-ISTD, AOH-ISTD, AME-ISTD, TEN-ISTD và TEA-ISTD, ví dụ ở nồng độ khối lượng $\rho = 750 \mu\text{g/mL}$.

Chuẩn bị dung dịch gốc, ví dụ hòa tan 1,12 mg bột tinh thể ALT-ISTD (5.18.1), AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3), TEN-ISTD (5.18.4) và TEA-ISTD (5.18.5) trong các lọ riêng rẽ với 1 500 μL methanol (5.5). Đồng hóa mạnh. Các dung dịch gốc bền trong ít nhất sáu tháng nếu được bảo quản ở $\leq -18^\circ\text{C}$. TEA-ISTD có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch methanol với nồng độ xấp xỉ như nhau.

5.23 Dung dịch nội chuẩn 1.

Chuẩn bị hỗn hợp chuẩn trong methanol có chứa AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3) và TEN-ISTD (5.18.4) ở nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$, ALT-ISTD (5.18.1) ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ và TEA-ISTD (5.18.5) ở nồng độ 25 $\mu\text{g/mL}$.

Với mục đích đó, chuyển 33 μL dung dịch gốc của AOH-ISTD, AME-ISTD và TEN-ISTD (5.22) vào bình định mức 5 mL. Chuyển, ví dụ 67 μL dung dịch gốc của ALT-ISTD (5.22) và ví dụ 167 μL dung dịch gốc TEA-ISTD (5.22) vào cùng một bình định mức 5 mL. Thêm methanol (5.5) đến vạch. Đồng hóa mạnh. Dung dịch nội chuẩn 1 bền trong ít nhất sáu tháng nếu được bảo quản ở $\leq -18^\circ\text{C}$.

5.24 Dung dịch nội chuẩn 2

Chuẩn bị hỗn hợp chuẩn trong methanol có chứa AOH-ISTD (5.18.2), AME-ISTD (5.18.3) và TEN-ISTD (5.18.4) ở nồng độ 500 ng/mL, ALT-ISTD (5.18.1) ở nồng độ 1 000 ng/mL và TEA-ISTD (5.18.5) ở nồng độ 2 500 ng/mL. Dung dịch nội chuẩn 2 được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch nội chuẩn 1 (5.23).

Chuyển 1 000 μL dung dịch nội chuẩn 1 (5.23) vào bình định mức 10 mL. Thêm methanol (5.5) đến vạch. Đồng hóa mạnh. Dung dịch nội chuẩn 2 bền trong ít nhất sáu tháng nếu được bảo quản ở $\leq -18^\circ\text{C}$.

5.25 Polysorbat 20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$) (Tween®20¹⁾), loại phân tích.

¹Tween®20 là tên thương mại của chất hoạt động bề mặt không ion loại polysorbate 20 có sẵn từ các nhà cung cấp khác nhau. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

5.26 Dung dịch Polysorbat 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆), φ = 2 % trong nước.

Dùng pipet lấy 2 mL polysorbat 20 (5.25) cho vào bình định mức 100 mL và thêm nước (5.2) đến vạch. Trộn đều. Dung dịch này có thể được sử dụng trong ba tháng nếu được bảo quản ở nhiệt độ xấp xỉ 4 °C.

5.27 Dung dịch hiệu chuẩn

Thêm các thể tích khác nhau của dung dịch chuẩn (5.20 tương ứng với 5.21) và dung dịch nội chuẩn 2 (5.24) vào năm lọ HPLC (6.18), ví dụ như liệt kê trong Bảng 1. Thêm các thể tích methanol (5.5) được quy định trong Bảng 1 và trộn nhẹ. Thêm 600 µL pha động HPLC A (5.15), đậy nắp lọ và trộn đều (6.15) trong khoảng 20 s.

Chuẩn bị lọ thứ sáu (mẫu trắng) không có dung dịch chuẩn, không có dung dịch nội chuẩn và sử dụng lọ này làm mẫu trắng thiết bị.

Bảng 1 – Chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn

Dung dịch hiệu chuẩn	Dung dịch chuẩn 1 (5.20) µL	Dung dịch chuẩn 2 (5.21) µL	Dung dịch nội chuẩn 2 (5.24) µL	Methanol (5.5) µL	ALT	AOH	AME	TEN	TEA
					Nồng độ đương lượng µg/kg				
1	–	10	50	340	1	1	1	5	10
2	–	50	50	300	5	5	5	25	50
3	–	100	50	250	10	10	10	50	100
4	50	–	50	300	25	25	25	125	250
5	200	–	50	150	100	100	100	500	1000
Mẫu trắng	–	–	–	400	–	–	–	–	–

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 Máy đo pH.

6.2 Ống ly tâm polypropylen (PP), (50 mL) có chia vạch.

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

6.4 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 mg.

6.5 Máy lắc dọc hoặc lắc ngang cơ học có thể điều chỉnh được.

- 6.6 Thiết bị trộn tốc độ cao** (ví dụ: Ultra- turrax ®²⁾.
- 6.7 Máy ly tâm**, có kiểm soát nhiệt độ và có khả năng tạo ra lực ly tâm tương đối xấp xỉ 3 200g.
- 6.8 Pipet định mức chia vạch**, dung tích 10 mL.
- 6.9 Pipet xả hết**, ví dụ: dung tích 10 µL , 20 µL, 100 µL, 250 µL và 1 000 µL, có đầu tip thích hợp.
- 6.10 Cột chiết pha rắn (SPE)**, bằng polyme styren biến tính ưa nước với dung tích bình chứa 6 mL, khối lượng chất hấp phụ 200 mg và kích thước hạt 100 µm hoặc nhỏ hơn.
- CHÚ THÍCH Phenomenex Strata-XL 2 , với dung tích bình chứa 6 mL, khối lượng chất hấp phụ 200 mg, cỡ hạt 100 µm đã cho thấy đáp ứng các thông số kỹ thuật này.
- 6.11 Bình chứa PP (khoảng 25 mL)**, vừa với cột SPE (6.10).
- 6.12 Bộ lọc xyranh polytetrafluoroethylen (PTFE)**, cỡ lỗ 0,2 µm và ví dụ đường kính 13 mm hoặc 15 mm.
- 6.13 Xyranh có kim bơm**, dung tích 1 mL.
- 6.14 Bộ lọc chân không (vacuum manifold)**, để làm sạch SPE, có vòi khóa.
- 6.15 Máy trộn**, có tốc độ cao.
- 6.16 Máy cô đặc mẫu**, có kiểm soát nhiệt độ và nguồn khí cấp.
- 6.17 Ống thu nhận bằng thủy tinh**, dùng để rửa giải và bay hơi mẫu.
- 6.18 Lọ HPLC thủy tinh silan hóa**, dung tích khoảng 1,5 mL và nắp vặn hoặc tương đương.
- 6.19 Cốc có mở**, dung tích 250 mL.
- 6.20 Bình định mức**, dung tích 5 mL, 10 mL, 50 mL, 100 mL và 1 L.
- 6.21 Hệ thống HPLC-MS/MS**, có các bộ phận sau.
- 6.21.1 Bơm HPLC**, có khả năng duy trì gradient nhị phân ở tốc độ dòng phù hợp với cột phân tích đang sử dụng với độ chính xác thích hợp.
- 6.21.2 Bộ khử khí**, tùy chọn, để khử khí cho pha động HPLC.

²⁾ Ultra- turrax và Strata-XL là những ví dụ về các sản phẩm phù hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

6.21.3 Hệ thống bơm mẫu, có khả năng bơm một lượng dung dịch thử thích hợp, đáp ứng yêu cầu về độ chính xác.

6.21.4 Cột pha đảo HPLC

Cột phù hợp và các điều kiện HPLC thích hợp cung cấp đủ khả năng lưu giữ chất phân tích rửa giải đầu tiên. Sắc ký đồ chấp nhận được, như nêu trong Phụ lục A, có thể đạt được bằng cách sử dụng cột có hệ số công suất tối thiểu là 3 ($K' \geq 3,0$) và số đĩa tối thiểu là 2 000 ($N \geq 2\,000$) cho bất kỳ chất phân tích nào.

Ví dụ về các cột và điều kiện phân tích phù hợp được nêu trong Phụ lục A và Phụ lục B.

6.21.5 Tiền cột, được khuyến cáo sử dụng, có cùng vật liệu pha tĩnh như cột phân tích (6.21.4).

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

6.21.7 Thiết bị khối phổ ba tứ cực

Thiết bị bẫy ion ba tứ cực hoặc bẫy ion tuyến tính tứ cực, cùng với các thiết bị khác, được trang bị giao diện ion hóa phun điện (ESI) và hoạt động ở chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM). Mọi chế độ ion hóa (thường là ion hoá âm, có thể ion hoá dương) mang lại hiệu suất ion hoá đạt yêu cầu đều có thể được sử dụng.

6.21.8 Hệ thống đánh giá dữ liệu và điều khiển thiết bị theo máy tính.

7 Cách tiến hành

7.1 Yêu cầu chung

Mọi thuốc thử, mẫu và thiết bị được sử dụng trong Điều 7.2 đến 7.5 phải ở nhiệt độ phòng trước khi thực hiện các thao tác, trừ khi có quy định khác.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Các mẫu phòng thử nghiệm dạng rắn phải được nghiền mịn và đồng hóa. Trong quá trình này không được để mẫu bị quá nóng. Có thể cần phải nghiền lạnh các mẫu chất béo.

Các mẫu bán rắn phải được trộn đều bằng cách lắc mạnh trong khoảng 10 min.

CHÚ THÍCH Khi áp dụng phương pháp trộn dạng nhão (slurry mixing), cần đạt được hỗn hợp chiết đã quy định. Hàm lượng dung môi hữu cơ thấp hơn có thể hạn chế khả năng chiết độc tố *Alternaria* ít tan trong nước.

7.3 Chiết

Cân 2,00 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào ống ly tâm 50 mL (6.2) cho một lần phân tích. Thêm 100 μ L dung dịch nội chuẩn 2 (5.24).

Đối với puree cà chua: thêm 14,0 mL hỗn hợp chiết (5.12). Đối với bột mì và hạt hướng dương: thêm 15,0 mL hỗn hợp chiết (5.12).

Đậy kín nắp ống và trộn đều trong khoảng 10 s để thu được huyền phù đồng nhất.

Bột hạt hướng dương có thể bị dính và tắc trong quá trình thao tác. Để chiết hoàn toàn, các mẫu này cần được phân tán đủ trong hỗn hợp chiết, dùng máy trộn tốc độ cao (6.6) để trộn trong khoảng 30 s trước khi chiết.

Lắc mạnh trong 45 min $\pm$ 1 min bằng máy lắc (6.5).

Một lượng nhỏ mẫu hạt hướng dương có thể dính vào thành ống trong quá trình chiết. Trong trường hợp này, lấy ống ra khỏi máy lắc và lắc bằng tay trong 5 s để mẫu không dính vào thành ống. Đưa các ống trở lại máy lắc và tiếp tục chiết.

Ly tâm mẫu ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 10 min ở khoảng 3 200g (6.7) và chuyển 7,5 mL phần nổi phía trên (bằng 1,0 g mẫu) vào ống ly tâm 50 mL mới (6.2).

Pha loãng bằng một thể tích tương đương (7,5 mL) dung dịch acid acetic 1 % (5.13). Đồng nhất bằng cách trộn đều trong khoảng 5 s.

Sau khi pha loãng dịch chiết, dung dịch có thể bị đục tùy thuộc vào mẫu. Có thể thực hiện ly tâm trong 10 min ở khoảng 3 200g và ở nhiệt độ phòng (6.7) để tránh làm tắc cột SPE.

7.4 Làm sạch bằng chiết pha rắn

Nối cột SPE (6.10) với bộ lọc chân không (6.14).

Ổn định cột bằng cách cho 7 mL methanol (5.4) đi qua cột, tiếp theo là 7 mL nước (5.2) và 4 mL dung dịch acid acetic 1 % (5.13).

Khoá cột và dùng pipet lấy thêm 3 mL dung dịch acid acetic 1 % (5.13) khác cho vào cột SPE. Gắn bình chứa (6.11) vào cột SPE.

Nạp mẫu đã pha loãng vào bình chứa. Rửa ống ly tâm 50 mL chứa mẫu đã pha loãng bằng 4 mL dung dịch acid acetic 1 % (5.13) và nạp vào bình chứa. Mở vòi và để dịch chiết chảy qua với tốc độ khoảng 1 giọt/giây.

Lấy bình chứa ra và rửa cột bằng 4 mL dung dịch polysorbat 20 (5.26), sau đó là 4 mL dung dịch acid

acetic 1 % (5.13). Làm khô cột hoàn toàn bằng chân không (khoảng 10 min).

7.5 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Đặt ống thu nhận bằng thủy tinh (6.17) vào bộ lọc chân không. Rửa giải dịch chiết bằng 7 mL dung dịch rửa giải (5.14) vào ống thu nhận bằng thủy tinh. Sau khi dung dịch đi qua, làm khô cột trong khoảng 10 s bằng chân không và thu lấy toàn bộ dịch rửa giải.

Nếu dung dịch rửa giải không chảy xuống một cách tự nhiên, có thể sử dụng chân không nhẹ để kích hoạt dòng chảy. Sau khi những giọt đầu tiên chảy ra khỏi cột thì không cần sử dụng chân không nữa.

Làm bay hơi dịch rửa giải trong ống thu nhận bằng thủy tinh (6.17) ở 50 °C bằng máy cô đặc mẫu (6.16), sử dụng dòng nitơ nhẹ (5.1).

Thêm 400 µL methanol (5.5) vào dịch chiết khô và hòa tan lại căn trên thành ống bằng cách trộn đều trong ít nhất 20 s.

Bổ sung 600 µL pha động A (5.15) HPLC và trộn đều thêm ít nhất 20 s.

Lọc dịch chiết qua bộ lọc xyranh PTFE (6.12), có dùng xyranh 1 mL (6.13), cho vào lọ HPLC (6.18).

Nếu quá trình lọc không tạo ra dung dịch thử trong thì có thể thực hiện ly tâm dung dịch thử.

7.6 Phân tích HPLC-MS/MS

7.6.1 Điều kiện vận hành HPLC-MS/MS

Sự kết hợp giữa cột phân tích, thành phần pha động, cài đặt gradient và thể tích bơm sao cho thu được sự phân tách sắc ký chấp nhận được của các chất phân tích và kết quả đáng tin cậy ở mức yêu cầu, với độ chọn lọc đủ.

Phụ lục A đưa ra ví dụ về sắc ký đồ và Phụ lục B đưa ra ví dụ về các điều kiện thích hợp đối với hệ thống HPLC-MS/MS.

7.6.2 Đường chuẩn

Trước khi bắt đầu trình tự bơm, thiết bị HPLC-MS/MS phải được cân bằng bằng cách bơm dung dịch trắng và dung dịch chuẩn không có nền mẫu cho đến khi có được tín hiệu ổn định.

Phân tích một lần các dung dịch hiệu chuẩn (5.27) khi bắt đầu quy trình bơm. Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách dựng đồ thị của tỷ lệ tín hiệu (diện tích pic của chất phân tích chia cho diện tích pic của chất nội chuẩn có gần đồng vị) theo nồng độ tương ứng trong dung dịch hiệu chuẩn được bơm vào (5.27). Thực hiện theo các hướng dẫn được đưa ra trong 7.8.

7.6.3 Trình tự bơm

Phân tích các dung dịch mẫu trắng và dung dịch thử mẫu theo trình tự sao cho tránh nhiễm từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo và tránh bị nhiễm chéo. Trình tự bơm sau đây đáp ứng tiêu chí này:

- mẫu trắng (5.27);
- năm dung dịch chuẩn hiệu chuẩn (5.27) với nồng độ từ thấp đến nồng độ cao nhất;
- mẫu trắng (5.27);
- dung dịch mẫu thử;
- mẫu trắng (5.27).

CHÚ THÍCH Thực tế cho thấy rằng ở nồng độ AME (5.17.3) cao có thể dẫn đến hiệu ứng nhiễm từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo.

7.7 Định danh

Định danh từng độc tố *Alternaria* bằng cách so sánh thời gian lưu trong dung dịch mẫu thử với thời gian lưu của các chất trong dung dịch hiệu chuẩn.

Thời gian lưu của chất phân tích trong sắc ký đồ mẫu phải tương ứng với thời gian lưu trung bình của các chất chuẩn hiệu chuẩn được đo theo cùng một trình tự với dung sai $\pm 0,2$ min hoặc ± 50 % chiều rộng pic ở nửa chiều cao (tùy theo giá trị nào lớn hơn). Thời gian lưu của chất phân tích phải tương ứng với thời gian lưu của chất nội chuẩn có gần đồng vị với dung sai $\pm 0,05$ min [9].

Tỷ lệ ion xác định là tín hiệu của pic ion có diện tích thấp hơn chia cho tín hiệu của pic ion có diện tích cao hơn (cường độ tương đối) từ các dung dịch hiệu chuẩn.

Tỷ lệ ion quan sát được trong sắc ký đồ của mẫu thử phải phù hợp (± 30 % dung sai) với tỷ lệ ion trung bình tương ứng trong các dung dịch hiệu chuẩn theo cùng một trình tự [9].

7.8 Hiệu chuẩn

Các pic của chất nội chuẩn phải luôn nhìn thấy được (các diện tích có thể khác nhau tùy thuộc vào nền mẫu) trong sắc ký hiệu chuẩn và sắc ký mẫu.

Chuyển khối ion MRM có tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu lớn nhất cần được chọn làm ion định lượng. Chuyển khối MRM được chọn của chất nội chuẩn tương ứng có cùng đặc điểm với chất phân tích nhưng được gần đồng vị. Diện tích pic trong sắc ký đồ ion chiết tương ứng được sử dụng trong tất cả các phép tính tiếp theo.

Tính tỷ lệ tín hiệu của từng độc tố *Alternaria* với chất nội chuẩn có gần đồng vị tương ứng theo Công thức (1).

$$RR_{An} = \frac{A_{An}}{A_{ISTD}} \tag{1}$$

Trong đó:

RR_{An} là tỷ lệ tín hiệu của chất phân tích trong sắc ký đồ của dung dịch hiệu chuẩn;

A_{An} là diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch hiệu chuẩn;

A_{ISTD} là diện tích pic của chất nội chuẩn có gần đồng vị trong dung dịch hiệu chuẩn.

Dựng đồ thị tỷ lệ tín hiệu của chất phân tích (trục y) trong dung dịch hiệu chuẩn theo phần khối lượng tương ứng [µg/kg] (trục x) và xác định đường chuẩn bằng hàm hồi quy tuyến tính theo Công thức (2). Xác định các tham số của hàm hồi quy tuyến tính.

Để xác định hàm lượng của chất phân tích mà có tỷ lệ tín hiệu (RR_{An}) nằm giữa hai điểm hiệu chuẩn tương ứng với nồng độ thấp nhất thì đường chuẩn có thể phải đi qua gốc tọa độ (đường thẳng đi qua điểm 0). Có thể chấp nhận việc sử dụng trọng số bằng $1/x$ hoặc $1/x^2$ nếu việc ấn định đường hồi quy qua gốc tọa độ dẫn đến độ lệch cho các điểm hiệu chuẩn thấp hơn.

$$RR_{An,Cal} = w_{An,Cal} \times a_1 + b_0 \tag{2}$$

Trong đó:

$RR_{An,Cal}$ là tỷ lệ tín hiệu của chất phân tích trong dung dịch hiệu chuẩn;

$w_{An,Cal}$ là phần khối lượng của chất phân tích trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng microgam trên kilogram (µg/kg);

a_1 là độ dốc của đường chuẩn, được ước tính bằng hồi quy bình phương nhỏ nhất từ dữ liệu hiệu chuẩn;

b_0 là giao điểm của đường chuẩn với trục y, được ước tính bằng hồi quy bình phương nhỏ nhất từ dữ liệu hiệu chuẩn.

8 Tính kết quả

Phần khối lượng của từng độc tố *Alternaria* trong mẫu, $w_{An,S}$, biểu thị bằng microgam trên kilogram (µg/kg), được tính bằng Công thức (3):

$$w_{An,S} = \frac{RR_{An,S} - b_0}{a_1} \quad (3)$$

Trong đó:

$RR_{An,S}$ là tỷ lệ tín hiệu của chất phân tích quan sát được trên sắc ký đồ của dung dịch mẫu thử.

Nếu một hoặc nhiều tỷ lệ tín hiệu trong mẫu thử nghiệm ($RR_{An,S}$) cao hơn tỷ lệ tín hiệu của chất phân tích tương ứng trong dung dịch hiệu chuẩn cao nhất ($RR_{An,Ca1}$) (nghĩa là vượt quá dải hiệu chuẩn), thì phân tích lại mẫu thử. Trong trường hợp này, chiết phần thứ hai gồm 2,00 g mẫu với bội số (ví dụ gấp đôi) tất cả các thể tích được thêm vào (ví dụ: 30 mL hỗn hợp chiết (5.12) đối với mẫu dạng rắn, 28 mL hỗn hợp chiết (5.12) đối với puree cà chua và 200 μ L dung dịch nội chuẩn 2 (5.24)). Xem xét yếu tố này để xác định phần khối lượng của chất phân tích.

9 Độ chụm

9.1 Yêu cầu chung

Chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được tóm tắt trong Phụ lục C. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với các giá trị nêu trong Phụ lục C. Chi tiết hơn về kết quả thử nghiệm liên phòng thử nghiệm, xem Tài liệu [10].

9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau do một người thực hiện, sử dụng cùng một thiết bị, thực hiện trong khoảng thời gian ngắn nhất có thể, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r trong Bảng 2 và Bảng 3. Các tham số hồi quy tuyến tính của độ lặp lại là hàm số của giá trị trung bình được nêu trong Bảng 4.

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, do hai phòng thử nghiệm thực hiện, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R trong Bảng 2 và Bảng 3. Các tham số hồi quy tuyến tính của độ tái lập là hàm số của giá trị trung bình được nêu trong Bảng 4.

Bảng 2 – Dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng đối với TEA, ALT và AOH

Mẫu	TEA			ALT			AOH		
	Giá trị trung bình µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Giá trị trung bình µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg	Giá trị trung bình µg/kg	<i>r</i> µg/kg	<i>R</i> µg/kg
Hạt hướng dương số 1 (nc)	1 618	196	509	< 1	-	-	31,9	9,80	13,1
Hạt hướng dương số 2 (nc)	936	123	356	< 1	-	-	15,2	4,30	8,13
Hạt hướng dương số 3 (nc)	488	59,8	197	< 1	-	-	5,37	2,04	3,5
Hạt hướng dương số 4 (nc, spk)	147	16,7	35,8	2,49	. a	-	1,97	0,68	0,99
Hạt hướng dương số 5 (nc, spk)	198	38,2	64,7	10,2	3,06	5,81	8,47	2,76	4,74
Puree cà chua số 1 (nc)	961	90,5	164	0,95	-	-	27,4	4,77	9,67
Puree cà chua số 2 (nc)	499	50,4	112	< 1	-	-	12,9	1,84	5,64
Puree cà chua số 3 (nc)	183	12,9	32,2	<1	-	-	6,06	1,37	2,41
Puree cà chua số 4 (spk)	47,0	5,40	13,7	2,18	0,59	1,14	1,82	0,24	0,72
Puree cà chua số 5 (spk)	194	19,6	45,1	11,2	2,08	5,19	9,68	1,70	3,73
Lúa mì số 1 (nc)	264	39,5	55,0	< 1	-	-	2,04	-	-
Lúa mì số 2 (nc)	162	26,5	40,3	<1	-	-	1,83	0,74	1,39
Lúa mì số 3 (nc, spk)	41,8	6,33	10,2	13,8	3,08	8,33	46,7	9,37	19,9
Lúa mì số 4 (spk)	55,1	4,80	13,2	4,73	1,04	4,14	4,90	1,13	1,85
Lúa mì số 5 (nc, spk)	413	27,3	85,2	9,16	1,31	8,22	14,4	3,87	7,69
nc: mẫu nhiễm tự nhiên.									
spk: mẫu thêm chuẩn.									
a bộ dữ liệu không đủ số lượng.									

Bảng 3 – Dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng đối với TEN và AME

Mẫu	TEN				AME		
	Giá trị trung bình	<i>r</i>	<i>R</i>		Giá trị trung bình	<i>r</i>	<i>R</i>
	µg/kg	µg/kg	µg/kg		µg/kg	µg/kg	µg/kg
Hạt hướng dương số 1 (nc)	75,2	9,83	21,9		12,2	3,24	4,90
Hạt hướng dương số 2 (nc)	38,9	5,84	11,0		7,83	1,27	3,01
Hạt hướng dương số 3 (nc)	19,2	1,57	5,29		3,74	1,21	1,59
Hạt hướng dương số 4 (nc, spk)	47,8	15,7	17,7		2,03	0,58	1,09
Hạt hướng dương số 5 (nc, spk)	168	41,1	74,9		17,1	3,02	4,91
Puree cà chua số 1 (nc)	0,88	- ^a	-		16,4	1,85	5,30
Puree cà chua số 2 (nc)	0,57	-	-		6,19	0,88	1,90
Puree cà chua số 3 (nc)	0,49	-	-		2,69	0,27	0,89
Puree cà chua số 4 (spk)	44,9	2,85	11,8		1,98	0,25	0,72
Puree cà chua số 5 (spk)	218	23,3	96,2		9,74	0,82	2,42
Lúa mì số 1 (nc)	52,2	8,64	18,7		0,55	-	-
Lúa mì số 2 (nc)	5,29	0,85	3,67		1,29	0,60	0,96
Lúa mì số 3 (nc, spk)	9,36	1,16	6,40		47,2	4,27	14,1
Lúa mì số 4 (spk)	31,2	3,96	10,6		4,87	0,45	1,44
Lúa mì số 5 (nc, spk)	86,8	17,8	41,3		14,8	1,60	3,13
nc: mẫu nhiễm tự nhiên							
spk: mẫu thêm chuẩn.							
^a bộ dữ liệu không đủ số lượng.							

Bảng 4 – Mối quan hệ hàm số giữa r , R và giá trị trung bình

$r = f(\text{Giá trị trung bình})$		TEA	ALT	AOH	TEN	AME
Hạt hướng dương	Độ dốc	0,125	-	0,306	0,227	0,206
	r^2	0,988	-	0,994	0,897	0,805
Purree cà chua	Độ dốc	0,095	0,188	0,171	0,105	0,109
	r^2	0,993	0,970	0,977	0,983	0,937
Lúa mì	Độ dốc	0,098	0,201	0,207	0,188	0,092
	r^2	0,463	0,842	0,978	0,962	0,969
$R = f(\text{Giá trị trung bình})$		TEA	ALT	AOH	TEN	AME
Hướng dương	Độ dốc	0,335	-	0,445	0,410	0,338
	r^2	0,974	-	0,939	0,952	0,866
Purree cà chua	Độ dốc	0,183	0,465	0,371	0,434	0,305
	r^2	0,958	0,998	0,979	0,983	0,970
Lúa mì	Độ dốc	0,211	0,709	0,435	0,438	0,292
	r^2	0,988	0,506	0,988	0,952	0,984

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải tuân theo TCVN ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025) và phải bao gồm ít nhất các dữ liệu sau:

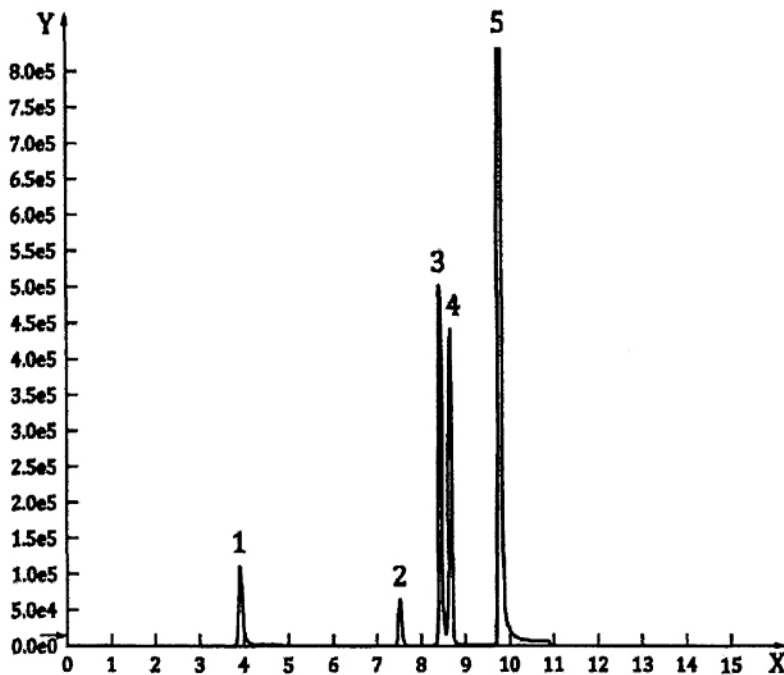
- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu (loại mẫu, ký hiệu);
- b) viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) ngày nhận mẫu và kiểu quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- d) ngày thử nghiệm;
- e) các kết quả thử nghiệm và đơn vị biểu thị, độ thu hồi phải được công bố cùng với các kết quả thử nghiệm, khi cần và các kết quả thử nghiệm có được hiệu chỉnh với các độ thu hồi đó hay không;
- f) mọi đặc điểm cụ thể quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- g) mọi thao tác không được quy định trong phương pháp này hoặc được coi là tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Ví dụ về sắc ký đồ

Hình A.1 được tạo bằng cột Waters XSelect HSST³⁾ (100 mm X đường kính trong 2,1 mm, cỡ hạt 2,5 µm) được gắn với tiền cột XSelect HSS T3 VanGuard³⁾ (ID 5 mm X 2,1 mm, cỡ hạt 2,5 µm) theo cài đặt được mô tả trong Phụ lục B.

**CHÚ DẪN**

X thời gian, tính bằng phút

3 AOH và AOH-d₃ 8,4 min

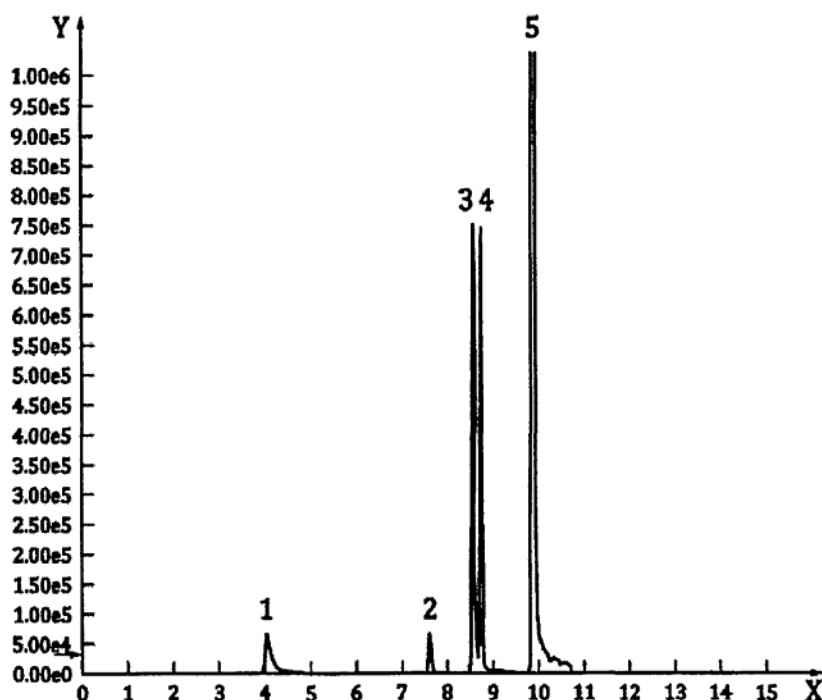
Y cường độ, tính bằng số lượng

4 TEN và TEN-d₃ 8,6 min1 TEA và TEA-¹³C₂ 3,9 min5 AME và AME-d₃ 9,8 min2 ALT và ALT-d₆ 7,5 min

Hình A.1 – Sắc ký đồ ion tổng số (TIC) của dung dịch chuẩn độc tố *Alternaria* và các chất nội chuẩn có gắn đồng vị tương ứng, tất cả đều ở nồng độ 50 ng/mL

³⁾ Waters XSelect HSS T3 và XSelect HSS T3 VanGuard là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

Hình A.2 được tạo ra bằng cách sử dụng các điều kiện tương tự ngoại trừ cột phân tích là Waters Acquity HSST3⁴⁾ (đường kính trong 100 mm x 2,1 mm, cỡ hạt 1,8 µm) được gắn với tiền cột VanGuard HSST3⁴⁾ (5 mm x đường kính trong 2,1 mm, cỡ hạt 1,8 µm). Hình A.3 cũng được tạo ra bằng cách sử dụng các điều kiện tương tự ngoại trừ cột phân tích là Phenomenex Gemini NXC18⁴⁾ (100 mm x đường kính trong 2,1 mm, cỡ hạt 3 µm).



CHÚ DẪN

X Thời gian, tính bằng phút

Y Cường độ, tính bằng số lượng

1 TEA và TEA-¹³C₂ 4,0 min

4 TEN và TEN-d₃ 8,7 min

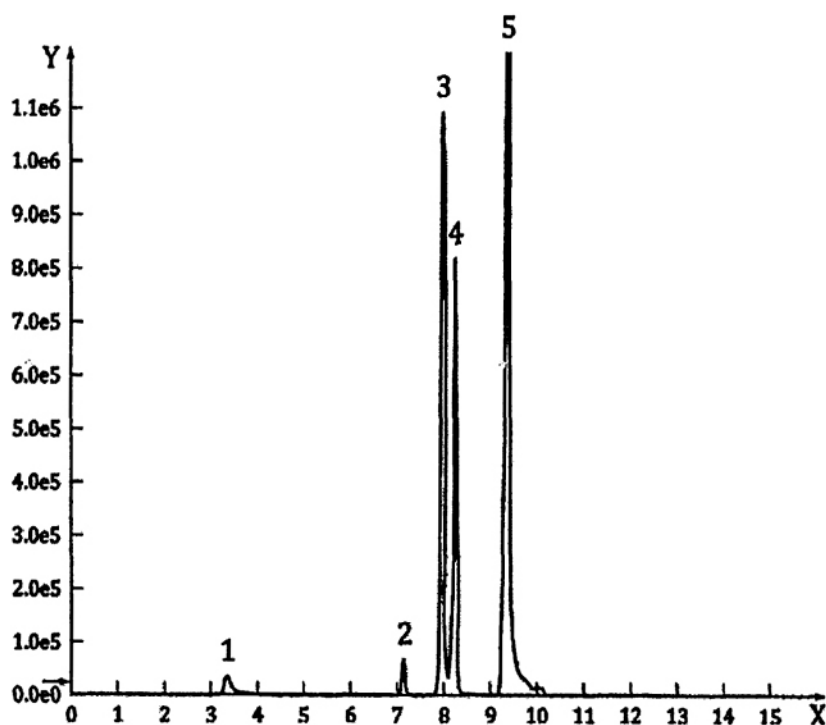
2 ALT và ALT-d₆ 7,6 min

5 AME và AME-d₃ 9,9 min

3 AOH và AOH-d₃ 8,5 min

Hình A.2 – Sắc ký đồ ion tổng số của dung dịch chuẩn chứa độc tố *Alternaria* và các chất nội chuẩn có gần đồng vị tương ứng, tất cả đều ở nồng độ 50 ng/mL thu được bằng cột Waters® Acquity HSS T3

⁴⁾ Waters Acquity HSST3, VanGuard HSST3 và Phenomenex Gemini NXC18 là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.



CHÚ DẪN

X Thời gian, tính bằng min

Y Cường độ, tính bằng số lượng

1 TEA và TEA- $^{13}\text{C}_2$ 3,3 min4 TEN và TEN- d_3 8,2 min2 ALT và ALT- d_6 7,1 min5 AME và AME- d_3 9,3 min3 AOH và AOH- d_3 7,9 min

Hình A.3 – Sắc ký đồ ion tổng số của dung dịch chuẩn độc tố *Alternaria* và các chất nội chuẩn có gắn đồng vị tương ứng, tất cả đều ở nồng độ 50 ng/mL thu được bằng cột Phenomenex® Gemini NX C18

Phụ lục B
(tham khảo)

Các điều kiện ví dụ đối với hệ thống HPLC-MS/MS phù hợp

Khi sử dụng cột (6.21.4) và pha động A (5.15) và B (5.16), các cài đặt dưới đây được cho là phù hợp. Ví dụ về sắc ký đồ được nêu trong Phụ lục A.

Những cài đặt này nên được coi là giá trị hướng dẫn. Các điều kiện sắc ký và phát hiện chính xác phụ thuộc vào thiết bị phân tích được sử dụng và do đó có thể thay đổi nhỏ. Đảm bảo rằng hệ thống phân tích phù hợp bằng cách đo các dung dịch chuẩn.

Cài đặt sắc đồ, thông số nguồn ion và thông số kỹ thuật khối phổ chung (xem thêm Bảng B.2, Bảng B.3 và Bảng B.4).

Cột	Waters XSelect HSS T3 ⁵⁾ có kích thước 100 mm × đường kính trong 2,1 mm và cỡ hạt 2,5 µm. Cột được trang bị tiền cột XSelect HSS T3 VanGuard với kích thước 5 mm × đường kính trong 2,1 mm và cỡ hạt 2,5 µm.
Thể tích bơm	5 µL
Nhiệt độ lấy mẫu tự động	10 °C
Nhiệt độ cột	30 °C có kiểm soát
Tốc độ dòng chảy	0,3 mL/min
Pha động	Gradient HPLC (5.15 và 5.16), xem Bảng B.1
Nguồn ion	Ion hóa phun điện (ESI)
Chế độ ion hóa	Âm tính
Detector	Bẫy ion tuyến tính tứ cực MS/MS
Thời gian phân tích	16 min

⁵⁾ Waters XSelect HSS T3 và XSelect HSS T3 VanGuard là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu chúng cho thấy kết quả tương đương.

Bảng B.1 – Gradient

Thời gian min	Pha động A %(φ)	Pha động B %(φ)
0,00	90	10
1,00	90	10
10,00	0	100
12,00	0	100
12,20	90	10
16,00	90	10

Nhiệt độ nguồn ion (đối với máy hóa hơi, khí sấy), dòng khí và điện áp (đối với mao quản) phụ thuộc vào thiết bị được sử dụng để phân tích và phải được tối ưu hóa trong mọi phòng thử nghiệm. Sau đây là cài đặt nguồn ion được tối ưu hóa cho các hệ thống Waters Micromass® Ultima PT⁶⁾, Thermo® TSQ Quantum Ultra6 và Sciex® QTrap 6500⁶⁾.

Ultima PT: nhiệt độ nguồn 125 °C, nhiệt độ khử dung môi 370 °C, lưu lượng khí sấy 902 L/h, lưu lượng khí lọc đầu vào 76 L/h và điện áp mao quản –2,8 kV.

TSQ Quantum Ultra: áp suất khí bay hơi 30 đơn vị không thứ nguyên (Arb), áp suất khí quét ion 10 Arb, áp suất khí phụ trợ 10 Arb, nhiệt độ thiết bị hóa hơi và mao quản 325 °C, điện áp mao quản –2,5 kV.

QTrap 6500: khí chắn (curtain gas) 20, khí va chạm - cao, điện áp phun ion –4,0 kV, nhiệt độ 600 °C, khí phun ion 1: 30, khí phun ion 2: 30.

Độc tố *Alternaria* có thể bị ion hóa ở chế độ ESI âm tạo ra [M-H]⁻ ion mẹ. Sự chuyển khối kiểm soát đa phản ứng (MRM) điển hình được nêu trong Bảng B2, Bảng B.3 và Bảng B.4. Các điện áp tương ứng (điện áp đi qua cổng ion, thấu kính ống, năng lượng va chạm), thời gian dừng (dwell times) và thời gian phân đoạn phụ thuộc vào thiết bị được sử dụng để phân tích và phải được tối ưu hóa trong mỗi phòng thử nghiệm. Các cài đặt được tối ưu hóa cho các hệ thống Waters Micromass® Ultima PT, Thermo® TSQ Quantum Ultra và Sciex® QTrap 6500 được nêu trong Bảng B2, Bảng B.3 và Bảng B.4 (sự chuyển khối ion định lượng được đề xuất được in đậm).

⁶⁾ Waters Micromass® Ultima PT, Thermo® TSQ Quantum Ultra và Sciex® QTrap 6500 là ví dụ về các sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu chúng cho thấy kết quả tương đương.

Bảng B.2 – Cài đặt chuyển khối MRM trên Waters Micromass® Ultima PT

Các hợp chất	Mảnh thời gian detector min	Ion mẹ [M-H] ⁺ (m/z)	Ion sản phẩm (m/z)	Điện áp khí lọc đầu vào V	Năng lượng va chạm V	Thời gian chờ s
TEA	1,8 đến 8,0	196,1	139,0 111,9	70	15 20	0,200 0,200
TEA- ¹³ C ₂		198,1	141,0 114,0	70	15 20	0,200 0,200
AOH	8 đến 9,3	257,1	215,0 146,7	50	20 20	0,150 0,150
AOH-d ₃		260,1	218,0 150,0	50	20 20	0,100 0,100
ALT	8 đến 9,3	291,2	248,1 202,9	50	20 30	0,150 0,150
ALT-d ₆		297,2	251,0 202,9	50	20 30	0,100 0,100
TEN	9,3 đến 10,3	413,1	271,2 141,2	50	15 15	0,200 0,200
TEN-d ₃		416,1	274,2 141,2	50	15 15	0,200 0,200
AME	10,3 đến 12	271,1	256,2 228,2	50	20 20	0,200 0,200
AME-d ₃		274,1	259,2 231,2	50	20 20	0,200 0,200

Bảng B.3 – Cài đặt chuyển khối MRM trên Thermo® TSQ Quantum Ultra

Các hợp chất	Mảnh thời gian detector min	Ion mẹ [M-H] ⁺ (m/z)	Ion sản phẩm (m/z)	Điện áp khí lọc đầu vào V	Năng lượng va chạm V	Thời gian chờ s
TEA	0 đến 4	196,1	139,1	80	20	0,200
			112,2		15	0,200
TEA- ¹³ C ₂		198,0	141,0	80	20	0,200
			114,0		15	0,200
AOH	4 đến 7	257,0	215,2	120	25	0,150
			147,0		30	0,150
AOH-d ₃		260,0	218,0	130	25	0,150
			150,0		30	0,150
ALT	4 đến 7	291,2	248,1	130	25	0,150
			214,1		20	0,150
ALT-d ₆		297,0	217,0	130	20	0,150
			203,2		30	0,150
TEN	7 đến 8	413,3	271,2	120	15	0,200
			141,0		20	0,200
TEN-d ₃		416,0	274,0	120	15	0,200
			141,0		20	0,200
AME	8 đến 20	271,0	256,2	100	25	0,200
			228,2		30	0,200
AME-d ₃		274,0	259,0	100	25	0,200
			231,0		30	0,200

Bảng B.4 – Cài đặt chuyển khối MRM trên Sciex® QTrap 6500

Các hợp chất	Mảnh thời gian detector min	Ion mẹ [M-H] ⁺ (m/z)	Ion sản phẩm (m/z)	DP ^a V	EP ^a V	CE ^a V	CXP ^a V
TEA	3,9	196,0	111,8	-55	-10	-32	-9
			139	-55	-10	-26	-7
TEA- ¹³ C ₂		197,9	113,9	-20	-10	-34	-13
			140,8	-20	-10	-28	-17
ALT	7,6	290,9	185,9	-80	-10	-34	-11
			214,1	-80	-10	-28	-13
ALT-d ₆		297,0	189	-90	-10	-38	-9
			216,9	-90	-10	-28	-13
AOH	8,4	256,9	212	-65	-10	-38	-9
			214,9	-65	-10	-38	-19
AOH-d ₃		260,0	215	-65	-10	-40	-13
			217,9	-65	-10	-38	-25
TEN	8,75	413,1	140,8	-65	-10	-24	-9
			271,1	-65	-10	-20	-15
TEN-d ₃		416,1	141	-60	-10	-26	-9
			274	-60	-10	-22	-17
AMR	9,8	270,9	227,8	-60	-10	-38	-13
			255,9	-60	-10	-28	-19
AME-d ₃		274,0	231,1	-60	-10	-38	-15
			258,8	-60	-10	-30	-27

^a CHÚ DẪN

DP: Điện thế phân mảnh.

EP: Điện thế đầu vào.

CE: Năng lượng va chạm.

CXP: Điện thế đầu ra của buồng va chạm, khoảng thời gian thu nhận trong MRM 90 s theo lịch trình.

Phụ lục C

(tham khảo)

Dữ liệu về độ chụm

Dữ liệu sau đây thu được từ một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm được phát triển để chuẩn hóa theo CEN M/520. Phương pháp này đã được thử nghiệm trong thử nghiệm liên phòng quốc tế thực hiện theo bộ tiêu chuẩn TCVN 6910 (ISO 5725) [11] nhằm xác nhận giá trị sử dụng các đặc tính của phương pháp phân tích.

Các tiêu đề của bảng (Bảng C.1 đến Bảng C.10) đề cập đến các vật liệu được sử dụng trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm như sau.

Vật liệu từ 1 đến 3 của mỗi nền mẫu là vật liệu thương mại hoặc hỗn hợp bị ô nhiễm tự nhiên. Lúa mì số 3 còn được bổ sung thêm một lượng lớn chất phân tích đã biết.

Vật liệu 4 và 5 đã được đơn vị tổ chức nghiên cứu liên phòng thử nghiệm thêm vào một lượng lớn chất phân tích đã biết, cho dù có chứa hay không chứa chất ô nhiễm tự nhiên (phụ thuộc vào chất phân tích).

Vật liệu thử đã được phân phối cho 30 phòng thử nghiệm trong khi 24 phòng thử nghiệm báo cáo lại kết quả thu được khi áp dụng phương pháp được mô tả. Các phương pháp thống kê như được mô tả trong TCVN 6910-5 (ISO 5725-5) [11], đã được sử dụng trong đánh giá dữ liệu để tránh nhu cầu loại trừ các kết quả "ngoại lệ" riêng lẻ. Bảng C.1 đến Bảng C.10 trình bày tóm tắt các thông số thống kê chính cho mỗi chất phân tích.

Bảng C.2 – Dữ liệu độ chụm đối với TEA trong hạt hướng dương

Thông số	Hạt hướng dương số 1 (nc ^a)	Hạt hướng dương số 2 (nc)	Hạt hướng dương số 3 (nc)	Hạt hướng dương số 4 (nc)	Hạt hướng dương số 5 (nc, spk ^b)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	23	23	23	22	23
Số kết quả không phù hợp	4	4	4	3	4
Số kết quả được chấp nhận	19	19	19	19	19
Giá trị trung bình, $\bar{X}$, µg/kg	1618	936	488	147	198
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , µg/kg	70,1	44,0	21,4	5,96	13,7
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	4,3	4,7	4,4	4,1	6,9
Giới hạn lặp lại r , µg/kg	196	123	59,8	13,7	38,2
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , µg/kg	182	127	70,5	12,8	23,1
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	11,2	13,6	14,5	8,7	11,7
Giới hạn tái lập R , µg/kg	509	356	197	35,8	64,7
Giá trị HorRat	0,51	0,62	0,66	0,40	0,53
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	89,3	92,5	88,6	100,4	97,0
Mức thêm chuẩn, µg/kg	-	-	-	-	-
^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên. ^b spk: mẫu thêm chuẩn. ^c phần khối lượng đích do đơn vị tổ chức chỉ định.					

Bảng C.4 – Dữ liệu độ chụm đối với ALT trong hạt hướng dương

Thông số	Hạt hướng dương số 1 (nc ^a)	Hạt hướng dương số 2 (nc)	Hạt hướng dương số 3 (nc)	Hạt hướng dương số 4 (nc)	Hạt hướng dương số 5 (nc, spk ^b)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	2	3	2	8	14
Số kết quả không phù hợp	1	1	1	2	2
Số kết quả được chấp nhận	1	2	1	6	12
Giá trị trung bình, $\bar{X}$, µg/kg	< 1	< 1	< 1	2,49	10,2
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , µg/kg	-	-	-	— ^d	1,09
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	-	-	-	-	10,7
Giới hạn lặp lại r , µg/kg	-	-	-	-	3,06
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , µg/kg	-	-	-	-	2,08
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	-	-	-	-	20,3
Giới hạn tái lập R , µg/kg	-	-	-	-	5,81
Giá trị HorRat	-	-	-	-	0,92
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	-	-	-	-	94,1
Mức thêm chuẩn, µg/kg	-	-	-	2,25	10,8
^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên. ^b spk: mẫu thêm chuẩn. ^c phần khối lượng đích thu được từ công thức. ^d bộ dữ liệu không đủ số lượng.					

Bảng C.5 – Dữ liệu độ chụm đối với AOH trong cà chua và lúa mì

Thông số	Puree cà chua số 1 (nc ^a)	Puree cà chua số 2 (nc)	Puree cà chua số 3 (nc)	Puree cà chua số 4 (spk ^b)	Puree cà chua số 5 (spk)	Lúa mì số 1 (nc)	Lúa mì số 2 (nc)	Lúa mì số 3 (spk)	Lúa mì số 4 (spk)	Lúa mì số 5 (spk)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	22	22	21	16	22	6	13	22	18	21
Số kết quả không phù hợp	4	4	3	3	4	1	0	3	2	3
Số kết quả được chấp nhận	18	18	18	13	18	5	13	19	16	18
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, $\mu\text{g/kg}$	27,4	12,9	6,06	1,82	9,68	2,04	1,83	46,7	4,90	14,4
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , $\mu\text{g/kg}$	1,70	0,66	0,49	0,09	0,61	— ^d	0,27	3,35	0,40	1,38
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	6,2	5,1	8,1	4,7	6,3	-	14,5	7,2	8,2	9,6
Giới hạn lặp lại r , $\mu\text{g/kg}$	4,77	1,84	1,37	0,24	1,70	-	0,74	9,37	1,13	3,87
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , $\mu\text{g/kg}$	3,45	2,01	0,86	0,26	1,33	-	0,50	7,09	0,66	2,75
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	12,6	15,6	14,2	14,2	13,8	-	27,1	15,2	13,5	19,2
Giới hạn tái lập R , $\mu\text{g/kg}$	9,67	5,64	2,41	0,72	3,73	-	1,39	19,8	1,85	7,69
Giá trị HorRat	0,57	0,71	0,65	0,64	0,63	-	1,23	0,69	0,61	0,87
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	100,1	98,0	104,5	91,0	96,7	-	105,2	94,9	95,9	92,9
Mức thêm chuẩn, $\mu\text{g/kg}$	-	-	-	2,00	10,0	-	-	49,2	5,11	15,5

^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên.^b spk: mẫu thêm chuẩn.^c phần khối lượng đích thu được từ công thức, trong các mẫu thêm chuẩn và do đơn vị tổ chức chỉ định, trong các mẫu nhiễm tự nhiên^d bộ dữ liệu không đủ số lượng.

Bảng C.6 – Dữ liệu độ chụm đối với AOH trong hạt hướng dương

Thông số	Hạt hướng dương số 1 (nc ^a)	Hạt hướng dương số 2 (nc)	Hạt hướng dương số 3 (nc)	Hạt hướng dương số 4 (spk ^b)	Hạt hướng dương số 5 (spk)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	21	22	21	16	21
Số kết quả không phù hợp	2	3	3	0	3
Số kết quả được chấp nhận	19	19	18	16	18
Giá trị trung bình, $\bar{X}$, µg/kg	31,9	15,2	5,37	1,97	8,47
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , µg/kg	3,50	1,53	0,73	0,24	0,99
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	11,0	10,1	13,6	12,4	11,6
Giới hạn lặp lại r , µg/kg	9,80	4,30	2,04	0,68	2,76
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , µg/kg	4,66	2,90	1,25	0,35	1,69
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	14,6	19,1	23,3	18,0	20,0
Giới hạn tái lập R , µg/kg	13,1	8,13	3,50	0,99	4,74
Giá trị HorRat	0,67	0,87	1,06	0,82	0,91
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	92,1	86,8	95,6	95,6	82,2
Mức thêm chuẩn, µg/kg	-	-	-	2,06	10,3
^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên. ^b spk: mẫu thêm chuẩn. ^c phần khối lượng đích thu được từ công thức.					

Bảng C.7 – Dữ liệu độ chụm đối với TEN trong cà chua và lúa mì

Thông số	Puree cà chua số 1 (nc ^a)	Puree cà chua số 2 (nc)	Puree cà chua số 3 (nc)	Puree cà chua số 4 (spk ^b)	Puree cà chua số 5 (spk)	Lúa mì số 1 (nc)	Lúa mì số 2 (nc)	Lúa mì số 3 (nc)	Lúa mì số 4 (spk)	Lúa mì số 5 (nc,spk ^c)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	6	6	4	24	24	22	21	20	22	22
Số kết quả không phù hợp	2	2	1	4	4	4	4	3	4	4
Số kết quả được chấp nhận	4	4	3	20	20	18	17	17	18	18
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, $\mu\text{g/kg}$	0,88	0,57	0,49	44,9	218	52,2	5,29	9,36	31,2	86,8
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , $\mu\text{g/kg}$	- ^e	-	-	1,02	8,31	3,08	0,30	0,41	1,41	6,37
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	-	-	-	2,3	3,8	5,9	5,7	4,4	4,5	7,3
Giới hạn lặp lại r , $\mu\text{g/kg}$	-	-	-	2,85	23,3	8,64	0,85	1,16	3,96	17,8
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , $\mu\text{g/kg}$	-	-	-	4,21	34,4	6,68	1,31	2,29	3,80	14,7
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	-	-	-	9,4	15,8	12,8	24,8	24,4	12,2	17,0
Giới hạn tái lập R , $\mu\text{g/kg}$	-	-	-	11,8	96,2	18,7	3,67	6,40	10,6	41,3
Giá trị HorRat	-	-	-	0,43	0,72	0,58	1,13	1,11	0,55	0,77
Độ thu hồi biểu kiến, % ^d	-	-	-	103,8	103,6	94,6	93,1	115,6	95,8	111,7
Mức thêm chuẩn, $\mu\text{g/kg}$	-	-	-	43,3	210	-	-	-	32,6	-

^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên.^b spk: mẫu thêm chuẩn.^c nc, spk: mẫu bị nhiễm tự nhiên, thêm chuẩn^d phần khối lượng đích thu được từ công thức, trong các mẫu thêm chuẩn và do đơn vị tổ chức chỉ định, trong các mẫu nhiễm tự nhiên.^e bộ dữ liệu không đủ số lượng.

Bảng C.8 – Dữ liệu độ chụm đối với TEN trong hạt hướng dương

Thông số	Hạt hướng dương số 1 (nc ^a)	Hạt hướng dương số 2 (nc)	Hạt hướng dương số 3 (nc)	Hạt hướng dương số 4 (spk ^b)	Hạt hướng dương số 5 (spk)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	24	24	23	24	24
Số kết quả không phù hợp	4	4	4	4	4
Số kết quả được chấp nhận	20	20	19	20	20
Giá trị trung bình, $\bar{X}$, µg/kg	75,2	38,9	19,2	47,8	168
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , µg/kg	3,51	2,09	0,56	5,59	14,7
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	4,7	5,4	2,9	11,7	8,7
Giới hạn lặp lại r , µg/kg	9,83	5,84	1,57	15,7	41,1
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , µg/kg	7,80	3,93	1,89	6,30	26,8
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	10,4	10,1	9,8	13,2	15,9
Giới hạn tái lập R , µg/kg	21,9	11,0	5,29	17,7	74,9
Giá trị HorRat	0,47	0,46	0,45	0,60	0,72
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	107,7	108,2	101,6	97,7	84,2
Mức thêm chuẩn, µg/kg	-	-	-	49,0	200
^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên. ^b spk: mẫu thêm chuẩn. ^c phần khối lượng đích thu được từ công thức, trong các mẫu thêm chuẩn và do đơn vị tổ chức chỉ định, trong các mẫu nhiễm tự nhiên.					

Bảng C.9 – Dữ liệu độ chụm đối với AME trong cà chua và lúa mì

Thông số	Puree cà chua số 1 (nc ^a)	Puree cà chua số 2 (nc)	Puree cà chua số 3 (nc)	Puree cà chua số 4 (spk ^b)	Puree cà chua số 5 (spk)	Lúa mì số 1 (nc)	Lúa mì số 2 (nc)	Lúa mì số 3 (spk)	Lúa mì số 4 (spk)	Lúa mì số 5 (spk)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	22	22	23	22	23	5	18	23	22	22
Số kết quả không phù hợp	3	3	3	2	3	1	2	4	3	3
Số kết quả được chấp nhận	19	19	20	20	20	4	16	19	19	19
Giá trị trung bình, $\bar{X}$, $\mu\text{g/kg}$	16,4	6,19	2,69	1,98	9,74	0,55	1,29	47,2	4,87	14,8
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , $\mu\text{g/kg}$	0,66	0,32	0,10	0,09	0,29	- ^d	0,21	1,52	0,16	0,57
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	4,0	5,1	3,6	4,5	3,0	-	16,5	3,2	3,3	3,9
Giới hạn lặp lại r , $\mu\text{g/kg}$	1,85	0,88	0,27	0,25	0,82	-	0,60	4,27	0,45	1,60
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , $\mu\text{g/kg}$	1,89	0,68	0,32	0,26	0,86	-	0,34	5,04	0,51	1,12
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	11,6	10,9	11,8	12,9	8,9	-	26,6	10,7	10,6	7,6
Giới hạn tái lập R , $\mu\text{g/kg}$	5,30	1,90	0,89	0,72	2,42	-	0,96	14,1	1,44	3,13
Giá trị HorRat	0,53	0,50	0,54	0,59	0,40	-	1,21	0,49	0,48	0,34
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	97,3	108,0	101,9	101,0	97,6	-	108,4	94,3	96,2	93,0
Mức thêm chuẩn, $\mu\text{g/kg}$	-	-	-	1,96	10,0	-	-	50,1	5,06	15,9

^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên.

^b spk: mẫu thêm chuẩn.

^c phần khối lượng đích thu được từ công thức, trong các mẫu thêm chuẩn và do đơn vị tổ chức chỉ định, trong các mẫu nhiễm tự nhiên.

^d bộ dữ liệu không đủ số lượng.

Bảng C.10 – Dữ liệu độ chụm đối với AME trong hạt hướng dương

Thông số	Hạt hướng dương số 1 (nc ^a)	Hạt hướng dương số 2 (nc)	Hạt hướng dương số 3 (nc)	Hạt hướng dương số 4 (spk ^b)	Hạt hướng dương số 5 (spk)
Năm thử nghiệm liên phòng	2018	2018	2018	2018	2018
Số phòng thử nghiệm	22	22	22	19	22
Số kết quả không phù hợp	2	2	3	1	2
Số kết quả được chấp nhận	20	20	19	18	20
Giá trị trung bình, $\bar{X}$, µg/kg	12,2	7,83	3,74	2,08	17,1
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r , µg/kg	1,16	0,45	0,43	0,21	1,08
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	9,5	5,8	11,5	9,9	6,3
Giới hạn lặp lại r , µg/kg	3,24	1,27	1,21	0,58	3,02
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , µg/kg	1,75	1,08	0,57	0,39	1,75
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	14,3	13,8	15,2	18,7	10,3
Giới hạn tái lập R , µg/kg	4,90	3,01	1,59	1,09	4,91
Giá trị HorRat	0,65	0,63	0,69	0,85	0,47
Độ thu hồi biểu kiến, % ^c	96,7	101,8	91,0	99,0	84,3
Mức thêm chuẩn, µg/kg	-	-	-	2,10	20,2
^a nc: mẫu bị nhiễm tự nhiên. ^b spk: mẫu thêm chuẩn. ^c phần khối lượng đích thu được từ công thức, trong các mẫu thêm chuẩn và do đơn vị tổ chức chỉ định, trong các mẫu nhiễm tự nhiên:-					

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of *Alternaria* toxins in food and feed. EFSA J. 2011,9 (10) pp. 1-97
 - [2] Escrivá L, Oucslati s., Font G., Manyes L. *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed: An Overview, Journal of Food Quality, Volume 2017, Article ID 1569748,20 pages
 - [3] Hickert s., Bergmann M., Ersen s., Cramer B., Humpf H.-U. Survey of *Alternaria* toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach. Mycotoxin Res. 2016,32 pp. 7-18
 - [4] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union Corrigendum in I, 036/84 of 05 February 2009 in its current version
 - [5] Asam et al. J. Agric. Food Chem. 2009,57 (12) pp. 5152-5160
 - [6] Montemurro V. *Alternaria*. Biology. Plant Diseases and Metabolites, 1992, pp. 449.
 - [7] Meyer et al./ Am. Chem. Soc. 1975.97 (13) pp. 3802-3809
 - [8] Shephard et al./ Chromatogr. A. 1991, 566 (1) pp. 195-205
 - [9] SANTE/12089/2016, Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. Implemented by 01/01/2017
 - [10] GONÇALVES c. et al. Determination of *Alternaria* toxins in tomato, wheat and sunflower seeds by SPE and LC-MS/MS - method validation through a collaborative trial. Available at: <https://doi.org/10.1093/jaQacInL/qsab094>
 - [11] TCVN 6910 (ISO 5725) (tất cả các phần), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo*
 - [12] TCVN ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025), *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn.*
-