

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 14434:2025

BS EN 17203:2021

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH CITRININ BẰNG SẮC KÝ LỎNG
HIỆU NĂNG CAO-HAI LẦN KHỐI PHỎ (HPLC-MS/MS)**

Foodstuffs – Determination of citrinin in food by HPLC-MS/MS

HÀ NỘI – 2025

Lời nói đầu

TCVN 14434:2025 hoàn toàn tương đương với BS EN 17203:2021;

TCVN 14434:2025 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 citrinin là một chất chuyển hóa thứ cấp của polyketid có trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi được sinh ra bởi một số loại nấm thuộc các chi *Penicillium* (ví dụ *P. citrinum*), *Aspergillus* (ví dụ *A. candidus*) và *Monascus* (ví dụ *M. purpureus*), chủ yếu sau thu hoạch. Citrinin xuất hiện chủ yếu trong các loại ngũ cốc được bảo quản như gạo, ngô, lúa mì, lúa mạch, yến mạch và lúa mạch đen. Citrinin có thể được tìm thấy như một chất gây ô nhiễm trong gạo đỏ lên men bởi *Monascus purpureus* và thực phẩm bổ sung theo công thức.

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 đưa ra 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: Citrinin được biết là có đặc tính gây độc cho thận, làm hỏng các ống lượn gần của thận [6].

Thực phẩm – Xác định citrinin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao-hai lần khối phổ (HPLC-MS/MS)

Foodstuffs – Determination of citrinin in food by HPLC-MS/MS

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng citrinin trong thực phẩm [ngũ cốc, gạo men đỏ (RYS)], thảo mộc và thực phẩm bổ sung bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao-hai lần khối phổ (HPLC-MS/MS).

Phương pháp này đã được xác nhận đối với citrinin trong gạo men đỏ và trong thực phẩm bổ sung theo công thức trong khoảng từ 2,5 µg/kg đến 3 000 µg/kg và trong bột mì trong khoảng từ 2,5 µg/kg đến 100 µg/kg.

Kinh nghiệm từ các phòng thử nghiệm cho thấy phương pháp này cũng có thể áp dụng đối với gạo trắng, các loại thảo mộc như bột lá bạch quả và thực phẩm bổ sung theo công thức trong khoảng từ 2,5 µg/kg đến 50 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

Phần mẫu thử được làm ẩm bằng dung dịch acid chlorhydric và được chiết bằng hỗn hợp ethyl acetat/acetonitril/acid acetic bằng trong 60 min. Magnesi sulfat và natri chloride được thêm vào dịch chiết, khuấy và ly tâm để loại bỏ nước và để hỗn hợp tách pha. Thu lấy phần dịch nổi phía trên, lọc, thêm dung dịch nội chuẩn và phân tích bằng LC-MS/MS pha đảo. Việc định lượng dựa trên mối liên hệ giữa tỷ lệ citrinin/citrinin- ^{13}C và nồng độ citrinin.

5 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước phù hợp với loại 1 của TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), trừ khi có quy định khác. Cũng có thể sử dụng các dung dịch có bán sẵn trên thị trường với các đặc tính tương đương với các dung dịch được nêu dưới đây.

5.1 Ethyl acetat, loại tinh khiết phân tích hoặc cao hơn.

5.2 Acetonitril, loại dùng cho LC-MS.

5.3 Acid acetic băng (CH_3COOH), loại tinh khiết phân tích hoặc cao hơn.

5.4 Acid acetic băng (CH_3COOH), loại dùng cho LC-MS.

5.5 Magnesi sulfat (MgSO_4), khan, loại tinh khiết phân tích hoặc cao hơn.

5.6 Natri chloride (NaCl), loại tinh khiết phân tích hoặc cao hơn.

5.7 Dung dịch acid chlorhydric (HCl), loại tinh khiết phân tích hoặc cao hơn, phần thể tích $\varphi(\text{HCl}) = 37\%$ (độ axit).

5.8 Nước (H_2O), đã khử ion (siêu tinh khiết).

5.9 Nước (H_2O), loại dùng cho LC-MS.

5.10 Methanol (MeOH), loại dùng cho LC-MS.

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

5.12 Dung dịch chiết 1

Cho 10 mL acid acetic băng (5.3) vào 990 mL nước (5.8) và trộn (nước + acid acetic băng, 99+1, phần thể tích). Hòa tan 100 g natri chloride (5.6) trong 1 L hỗn hợp này và thêm 16 mL dung dịch acid chlorhydric (5.7). Dung dịch này có thể sử dụng trong 1 tháng nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5.13 Dung dịch chiết 2

Trộn 240 mL acetonitril (5.2) với 750 mL ethyl acetat (5.1) và 10 mL acid acetic băng (5.3). Dung dịch này (ethyl acetat + acetonitril + acid acetic băng, 75+24+1, phần thể tích) có thể sử dụng trong 1 tháng nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5.14 Dung dịch pha loãng

Trộn 80 mL methanol (5.10), 18 mL nước (5.9) và 2 mL acid acetic băng (5.4). Dung dịch này (methanol + nước + acid acetic băng, 80+18+2, phần thể tích) có thể sử dụng trong 1 tháng nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

5.15 Amoni acetat/acid acetic băng trong nước

Hòa tan 9,5 g amoni acetat (5.11) trong 12,5 mL nước (5.9), sau đó thêm 12,5 mL acid acetic băng (5.4) và trộn kỹ. Dung dịch này có thể sử dụng trong 12 tháng nếu được bảo quản ở $< -18^{\circ}\text{C}$.

5.16 Pha động A: amoni acetat/acid acetic băng trong nước, nồng độ mol $c = 5\text{ mmol/l}$

Cho 1 mL amoni acetat/acid acetic băng trong nước (5.15) vào 999 mL nước (5.9) và trộn kỹ.

5.17 Pha động B: amoni acetat/acid acetic băng trong methanol, $c = 5\text{ mmol/l}$

Cho 1 mL amoni acetat/acid acetic băng trong nước (5.15) vào 999 mL methanol (5.10) và trộn kỹ.

5.18 Citrinin, chất chuẩn phân tích, độ tinh khiết $> 99\%$, ví dụ tinh thể hoặc dung dịch chuẩn đã được chứng nhận.

5.19 Dung dịch chuẩn gốc citrinin, nồng độ khối lượng $\rho = 500\text{ }\mu\text{g/mL}$

Cân 5 mg citrinin tinh thể, chính xác đến 0,1 mg cho vào bình định mức dung tích 10 mL và hòa tan với acetonitril (5.2) và thêm acetonitril đến vạch. Nồng độ khối lượng của dung dịch chuẩn gốc này phải được kiểm tra. Điều này có thể đạt được thông qua phép phân tích LC-MS/MS đối với dung dịch chuẩn đã được chứng nhận (5.18) hoặc bằng phương pháp đo quang xác định nồng độ sử dụng hệ số hấp thụ mol [8].

Có thể sử dụng dung dịch chuẩn đã được chứng nhận (5.18) làm dung dịch chuẩn gốc.

5.20 Dung dịch chuẩn làm việc citrinin, $\rho = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$

Dùng pipet lấy 1 mL dung dịch chuẩn gốc (5.19) cho vào 4 mL dung dịch pha loãng (5.14) và đồng hóa hỗn hợp.

Xác định và sử dụng hệ số hiệu chỉnh (xem 5.19) để hiệu chỉnh nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn làm việc ($\rho = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$). Có thể bỏ qua bước này khi sử dụng dung dịch chuẩn đã được chứng nhận (5.18).

Dung dịch chuẩn gốc và dung dịch chuẩn làm việc có thể sử dụng trong 12 tháng nếu được bảo quản

ở nhiệt độ $< -18\text{ }^{\circ}\text{C}$, tránh ánh sáng và tránh ẩm.

5.21 Dung dịch chuẩn trung gian citrinin, $\rho = 1\text{ }\mu\text{g/mL}$

Dùng pipet lấy 50 μL dung dịch chuẩn làm việc citrinin (5.20) cho vào 4 950 μL dung dịch pha loãng (5.14) để thu được 5 mL và đồng hóa hỗn hợp.

Sử dụng dung dịch chuẩn trung gian này làm dung dịch thêm chuẩn cho các thử nghiệm độ thu hồi. Dung dịch này có thể bền trong 3 tháng nếu được bảo quản trong bình màu nâu (6.13) ở $< -18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.22 Dung dịch chuẩn gốc citrinin- ^{13}C , dùng làm dung dịch chuẩn đã biết nồng độ khối lượng, ví dụ $\rho = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$

Sau khi mở, dung dịch chuẩn gốc có thể được sử dụng trong 12 tháng nếu được bảo quản ở $< -18\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong bình màu nâu (xem ngày hết hạn trong Giấy chứng nhận phân tích).

Nếu citrinin- ^{13}C ở dạng tinh thể thì hòa tan trong một lượng thích hợp acetonitril (5.2) để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ khối lượng phù hợp (ví dụ: $\rho = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$). Dung dịch chuẩn gốc này có thể sử dụng trong 12 tháng nếu được bảo quản ở $< -18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.23 Dung dịch chuẩn trung gian citrinin- ^{13}C , $\rho = 100\text{ ng/mL}$

Pha loãng dung dịch chuẩn gốc citrinin- ^{13}C (5.22) với dung dịch pha loãng (5.14) và trộn đều để thu được dung dịch chuẩn trung gian citrinin- ^{13}C ở nồng độ $\rho = 100\text{ ng/mL}$. Sử dụng dung dịch này làm chất nội chuẩn (ISTD) và thêm vào từng dịch chiết mẫu, dung dịch hiệu chuẩn (5.24) và dung dịch kiểm soát citrinin (5.25).

Dung dịch này có thể sử dụng trong 6 tháng nếu được bảo quản trong bình màu nâu ở nhiệt độ $< -18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kiểm tra độ ổn định của dung dịch này sau 6 tháng.

5.24 Dung dịch hiệu chuẩn

Chuẩn bị các dung dịch hiệu chuẩn (trong dải từ 0,25 ng/mL đến 50 ng/mL) ví dụ nêu trong Bảng 1, sử dụng dung dịch chuẩn trung gian citrinin (5.21) và dung dịch pha loãng (5.14). Đồng hóa các hỗn hợp.

Bắt đầu với dung dịch hiệu chuẩn 6, dung dịch này sau đó được sử dụng để chuẩn bị dung dịch hiệu chuẩn 1, 2 và 3 (xem Bảng 1).

Mỗi dung dịch hiệu chuẩn (từ 1 đến 6) lấy ra 45 μL , thêm 5 μL dung dịch chuẩn trung gian citrinin- ^{13}C (5.23) và trộn.

Cũng có thể tăng thể tích dung dịch hiệu chuẩn và dung dịch chuẩn trung gian theo một tỷ lệ khác.

Bảng 1 – Ví dụ về dung dịch hiệu chuẩn thích hợp

Dung dịch hiệu chuẩn	Nồng độ khối lượng ng/mL	Tổng thể tích μL	Dung dịch chuẩn trung gian citrinin (5.21) μL	Dung dịch hiệu chuẩn 6 μL	Dung dịch pha loãng (5.14) μL
1	0,25	1 000		5	995
2	0,5	1 000		10	990
3	1	1 000		20	980
4	10	1 000	10		990
5	20	1 000	20		980
6	50	1 000	50		950

5.25 Dung dịch kiểm soát citrinin, $\rho = 25 \text{ ng/mL}$

Chuẩn bị dung dịch kiểm soát citrinin từ dung dịch chuẩn đã được chứng nhận (5.18). Ngoài ra, chuẩn bị một dung dịch kiểm soát citrinin từ dung dịch chuẩn gốc citrinin độc lập thích hợp đã được kiểm tra bằng phương pháp đo quang hoặc đã được kiểm tra bằng dung dịch chuẩn đã được chứng nhận (5.18). Chuẩn bị dung dịch kiểm soát ($\rho = 25 \text{ ng/mL}$) bằng cách pha loãng dung dịch chuẩn gốc, sử dụng dung dịch pha loãng (5.14).

Thêm $5 \mu\text{L}$ dung dịch chuẩn trung gian citrinin- ^{13}C (5.23) vào $45 \mu\text{L}$ dung dịch kiểm soát trước khi phân tích. Dung dịch kiểm soát này bền trong 3 tháng nếu được bảo quản trong bình màu nâu ở nhiệt độ $< -18^\circ\text{C}$.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

Đối với dụng cụ thủy tinh, tốt nhất là sử dụng dụng cụ màu nâu để giảm tác động của ánh sáng và sự phân hủy citrinin.

6.1 Cân phòng thử nghiệm, độ chính xác $0,01 \text{ g}$.

6.2 Cân phân tích, độ chính xác $0,1 \text{ mg}$.

6.3 Máy lắc phòng thử nghiệm.

6.4 Máy ly tâm, thích hợp cho ống ly tâm dung tích 50 mL .

6.5 Máy ly tâm, thích hợp cho ống ly tâm dung tích $1,5 \text{ mL}$.

6.6 Pipet, có thể điều chỉnh, ví dụ từ 1 μL đến 1 000 μL , thích hợp cho dung môi hữu cơ, có đầu tip thích hợp.

6.7 Ống ly tâm, dung tích 50 mL.

6.8 Ống ly tâm, bằng polypropylen (ví dụ ống Eppendorf^{®1)}), dung tích 1,5 mL.

6.9 Xyranh, dung tích 2 mL.

6.10 Đầu lọc xyranh, bằng polytetrafluoroethylen (PTFE), có cỡ lỗ 0,2 μm .

6.11 Lọ nhỏ màu nâu dùng cho bộ bơm mẫu, có nắp vặn hoặc tương đương, dung tích 1,5 mL.

6.12 Ống lồng trong lọ nhỏ bằng thủy tinh.

6.13 Bình màu nâu.

6.14 Hệ thống LC-MS/MS, gồm các bộ phận sau:

6.14.1 Bơm LC, thích hợp cho quá trình rửa giải gradient.

6.14.2 Hệ thống bơm, có khả năng bơm một lượng dung dịch có độ chính xác thích hợp.

6.14.3 Cột LC, ví dụ cột HSST3 C18, cỡ hạt 1,8 μm , kích thước 2,1 mm $\times$ 100 mm và bộ lọc sơ bộ hoặc tiền cột tương ứng

Các cột có kích thước khác nhau cũng có thể được sử dụng khi đảm bảo phân tách đường nền nhằm phân biệt các pic của citrinin với tất cả các tín hiệu khác.

6.14.4 Bộ ổn nhiệt của cột.

6.14.5 Thiết bị đo hai lần khối phổ (MS/MS), có khả năng thực hiện ion hóa citrinin và theo dõi đa phản ứng (MRM) với dải động đủ rộng.

6.14.6 Hệ thống đánh giá dữ liệu.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền mịn mẫu phòng thử nghiệm, đồng hóa và bảo quản ở nơi tối trước khi lấy phần mẫu thử để phân tích.

¹⁾ Eppendorf là tên thương mại của ống ly tâm do Eppendorf International cung cấp. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn 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.

7.2 Chiết citrinin

Cân 4,00 g mẫu phòng thử nghiệm đã đồng nhất, chính xác đến 0,02 g, cho vào ống ly tâm 50 mL (6.7).

Thêm 10 mL dung dịch chiết 1 (5.12), sau đó thêm ngay 20 mL (V_{ex}) dung dịch chiết 2 (5.13) và đậy nắp ống.

Sử dụng máy lắc phòng thử nghiệm (6.3), lắc hỗn hợp trong khoảng 1 h, ở nhiệt độ phòng.

Sau đó, thêm 6,0 g magesi sulfat (5.5) và 1,5 g natri chloride (5.6) vào hỗn hợp và lắc mạnh ngay trong 30 s để tránh kết tinh muối.

CHÚ THÍCH Bước thực hiện này tỏa nhiệt và làm nóng lên vừa phải lượng chứa trong ống.

Lắc hỗn hợp bằng máy lắc phòng thử nghiệm (6.3) trong khoảng 3 min.

Tách các pha bằng cách ly tâm (6.4) trong khoảng 5 min ở khoảng 4 000g.

Lọc 1 mL pha hữu cơ qua bộ lọc xyranh PTFE (6.9, 6.10) vào ống ly tâm dung tích 1,5 mL (6.8). Để phân tích các mẻ có mức độ ô nhiễm cao (ví dụ giới hạn tối đa = 2 000 µg/kg), pha loãng dịch chiết đến 20 lần.

VÍ DỤ Pha loãng 10 µL dịch chiết của các mẫu bị ô nhiễm cao trong 190 µL dung dịch pha loãng (5.14) và đồng hóa hỗn hợp.

Nếu dịch chiết đã pha loãng này bị đục (đặc biệt với gạo men đỏ) thì chuyển một lượng dịch chiết đã pha loãng (> 1 mL) vào ống ly tâm 1,5 mL khác (6.8) và ly tâm lại ở khoảng 4 000g (6.5).

7.3 Quy trình thêm chuẩn

Thêm 80 µL dung dịch chuẩn trung gian citrinin (5.21) vào phần mẫu thử 4 g (tương ứng với phần khối lượng citrinin 20 µg/kg mẫu) và để cân bằng ít nhất 30 min ở nhiệt độ phòng. Đối với các mức ô nhiễm khác, chỉnh nồng độ thêm chuẩn bằng cách thêm thể tích thích hợp. Ngoài ra, có thể sử dụng chất chuẩn đã được chứng nhận.

Thêm 10 mL dung dịch chiết 1 (5.12), thêm ngay 20 mL (V_{ex}) dung dịch chiết 2 (5.13) và đậy nắp ống. Chiết citrinin ra khỏi mẫu như mô tả trong 7.2.

7.4 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Chuyển 45 µL dịch chiết đã lọc (7.2) vào ống lỏng (6.12), thêm 5 µL dung dịch chuẩn trung gian citrinin-¹³C (5.23) và trộn đều.

Đặt ống vào lọ nhỏ màu nâu (6.11) và vặn nắp lại.

Xử lý dung dịch hiệu chuẩn (5.24) và dung dịch kiểm soát (5.25) theo cách tương tự.

Bơm một lượng thích hợp các dung dịch thử này vào hệ thống LC-MS/MS (6.14) và lưu ý rằng việc phân tích LC-MS/MS phải được thực hiện trong vòng 24 h sau khi chiết, do tính không ổn định của citrinin.

7.5 Phân tích LC-MS/MS

7.5.1 Yêu cầu chung

Cột phân tích, thành phần pha động, chế độ cài đặt gradient và thể tích bơm phải được chọn và kết hợp sao cho các điều kiện này cho phép đạt được sự phân tách chấp nhận được và kết quả tin cậy ở mức yêu cầu, với độ chọn lọc đủ để thu được tỷ lệ nghi ngờ sai lệch thấp có thể chấp nhận được.

Tối ưu hóa các thông số phân tích (chọn chế độ ion hóa, chọn các mảnh khối ion mẹ và ion con, tối ưu hóa điện áp qua côn và năng lượng va chạm) bằng cách truyền và bơm từng dung dịch chuẩn phân tích citrinin và ISTD.

Để kiểm tra độ ổn định của hệ thống LC-MS/MS, bơm dung dịch kiểm soát (5.25).

7.5.2 Điều kiện vận hành LC-MS/MS

Bơm các dung dịch kiểm soát, dung dịch pha loãng và các dịch chiết theo thứ tự sau:

- Dung dịch kiểm soát (5.25; để kiểm tra xác nhận);
- Dung dịch pha loãng (5.14; để kiểm tra xác nhận mức độ nhiễm từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo qua các lần bơm mẫu);
- Dung dịch hiệu chuẩn (5.24);
- Dung dịch kiểm soát (5.25; để kiểm tra xác nhận tính phù hợp của hệ thống);
- Dịch chiết mẫu (7.3, 7.2) (bao gồm dung dịch pha loãng (5.14) và dung dịch kiểm soát (5.25) sau mỗi 6 lần đến 10 lần bơm mẫu);
- Dung dịch kiểm soát (5.25);
- Dung dịch pha loãng (5.14).

Khi sử dụng cột (6.14.3), pha động A (5.16) và pha động B (5.17), tỷ lệ rửa giải quy định trong Bảng A.1, các cài đặt sau đây được chứng minh là có thể áp dụng được.

Tốc độ dòng: 0,5 mL/min;

Nhiệt độ lò cột: 40 °C;

Thể tích bơm: 1 µL;

- Nguồn ion: phun điện;
- Chế độ ion hóa: chế độ ion âm;
- Kiểu phân tích: chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM) của 3 kênh;
- Cài đặt nguồn ion: nhiệt độ nguồn 150 °C, nhiệt độ khử dung môi 450 °C, dòng khí khử dung môi 1 000 L/h, dòng khí qua cột 150 L/h và điện áp mao quản 1 kV.

Các thông số cài đặt LC nêu trên có thể được coi như là giá trị hướng dẫn. Tùy thuộc vào cột được sử dụng, phải điều chỉnh tỷ lệ rửa giải và/hoặc tốc độ dòng sao cho đạt được sự phân tách tốt nhất giữa chất phân tích và các thành phần chiết khác của nền mẫu.

Khi sử dụng ion dương làm ion mẹ và sự thất thoát ion dương đóng vai trò chuyển khối ion định lượng, thì phải theo dõi ít nhất hai ion định tính.

Các thông số khối phổ thích hợp được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2 – Các điều kiện khối phổ riêng của chất để phân tích citrinin

Chất phân tích	Thời gian lưu min	Ion mẹ [M + MeOH-H] ⁺ m/z	Điện áp qua cổng ion V	Ion con m/z (năng lượng va chạm)		
				Ion định lượng	Ion định tính thứ 1	Ion định tính thứ 2
Citrinin	3,8	281,0	50	249,0 (15 eV)	205,0 (25 eV)	177,0 (30 eV)
Citrinin- ¹³ C		294,0	50	262,0 (15 eV)	na ^a	na
^a không áp dụng.						

Do đó, các điều kiện đo tối ưu đối với ion định lượng và ion định tính phải được xác định phụ thuộc vào cấu hình cửa từng thiết bị. Quá trình chuyển khối có tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu lớn nhất phải được chọn làm ion định lượng.

Có thể đạt được độ nhạy tối đa thông qua việc chọn chế độ ion hóa tối ưu, các ion mẹ và ion con cũng như tối ưu hóa điện áp qua cột và năng lượng va chạm.

Các ví dụ về sắc ký đồ được liệt kê trong Phụ lục B.

7.6 Định danh

Xác định citrinin bằng cách so sánh thời gian lưu của dung dịch hiệu chuẩn với thời gian lưu của dung dịch mẫu thử. Xác định chất phân tích dựa trên ít nhất hai lần chuyển khối. Ngoài ra, thời gian lưu (các pic ở cả hai vết khối lượng) và tỷ lệ diện tích pic phải phù hợp với dung dịch hiệu chuẩn.

Thời gian lưu và các tỷ lệ ion phải phù hợp [3].

8 Tính kết quả

8.1 Yêu cầu chung

Tiến hành hiệu chuẩn đa điểm bằng dung dịch hiệu chuẩn (xem ví dụ trong Bảng 1).

CHÚ THÍCH Dải độ thu hồi được chấp nhận được nêu trong Tài liệu tham khảo [4] và [7].

8.2 Tính toán với chất nội chuẩn

Thực hiện hiệu chuẩn đa điểm (dựng đường chuẩn tuyến tính bằng cách dựng đồ thị tỷ lệ citrinin/citrinin-¹³C đo được trong các dung dịch hiệu chuẩn theo nồng độ nêu trong Bảng 1).

Đối với đồ thị hồi quy tuyến tính, tỷ lệ diện tích pic của chất phân tích so với tỷ lệ nồng độ tương ứng. Nồng độ khối lượng của citrinin trong dung dịch đã bơm được suy ra từ phương trình hồi quy tuyến tính, tính bằng nanogram trên mililit (ng/mL), xem Công thức (1):

$$\frac{A_a}{A_{ISTD}} = a_{Cal} \frac{\rho_a}{\rho_{ISTD}} + b_{Cal} \quad (1)$$

Trong đó:

A_a là diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch hiệu chuẩn;

A_{ISTD} là diện tích pic của chất nội chuẩn trong dung dịch hiệu chuẩn;

a_{Cal} là độ dốc của đường chuẩn được xác định bởi các dung dịch hiệu chuẩn;

ρ_a là nồng độ khối lượng của chất phân tích trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng nanogram trên mililit (ng/mL);

ρ_{ISTD} là nồng độ khối lượng chất nội chuẩn trong dung dịch hiệu chuẩn, tính bằng nanogram trên mililit (ng/mL);

b_{Cal} là giao điểm của đường chuẩn với trục tung được xác định bởi các dung dịch hiệu chuẩn.

Tính nồng độ khối lượng của chất phân tích trong dung dịch mẫu thử ρ_a^s , bằng nanogram trên mililit (ng/mL) theo Công thức (2):

$$\rho_a^s = \frac{\frac{A_a^s}{A_{ISTD}^s} - b_{Cal}}{a_{Cal}} \rho_{ISTD}^s \quad (2)$$

Trong đó:

A_a^s là diện tích pic của chất phân tích trong dung dịch mẫu thử;

b_{Cal} là giao điểm trục của đường hiệu chuẩn được xác định bởi các dung dịch hiệu chuẩn;

A_{SDTD}^s là diện tích pic của chất nội chuẩn trong dung dịch mẫu thử;

a_{Cal} là độ dốc của đường chuẩn được xác định bởi các dung dịch hiệu chuẩn;

ρ_{SDTD}^s là nồng độ khối lượng của chất nội chuẩn trong dung dịch mẫu thử, tính bằng nanogam trên mililit (ng/mL).

Tính phần khối lượng w_a của chất phân tích trong phần mẫu thử, tính bằng nanogam trên gam (ng/g) theo Công thức (3):

$$w_a = \frac{\rho_a^s \times V_{ex}}{m_s} \text{ hoặc } w_a = \rho_a^s \times D \quad (3)$$

Trong đó:

ρ_a^s là nồng độ khối lượng của chất phân tích trong dung dịch mẫu thử, tính bằng nanogam trên mililit (ng/mL);

V_{ex} là thể tích dung dịch chiết (ở đây là: 20,0 mL);

m_s là khối lượng của phần mẫu thử (ở đây là: 4,0 g);

D là hệ số pha loãng ($D = 5,0$), bằng V_{ex}/m_s và khi cần thiết, áp dụng hệ số pha loãng bổ sung (20 lần) để có $D = 100$.

Phần mềm xử lý dữ liệu có thể được sử dụng để tự động kết hợp việc hiệu chỉnh những ảnh hưởng lên nền mẫu (chất nội chuẩn citrinin- ^{13}C) và hệ số pha loãng ($D = 5$, do bước chiết và nếu cần pha loãng bổ sung thì hệ số pha loãng bổ sung là 20).

Kết quả hiệu chỉnh độ thu hồi được tính bằng Công thức (4).

$$w_a, \text{ đã hiệu chỉnh} = \frac{w_a}{RR} \times 100 \quad (4)$$

Trong đó:

w_a , đã hiệu chỉnh là phần khối lượng đã hiệu chỉnh của chất phân tích, tính bằng nanogam trên gam (ng/g);

w_a là phần khối lượng của chất phân tích, tính bằng nanogram trên gam (ng/g);

RR là phần trăm hiệu suất thêm chuẩn thu được từ thử nghiệm về độ thu hồi.

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 dải nồng độ và nền mẫu đã nêu trong Phụ lục C.

9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r trong Bảng 3.

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau bởi hai phòng thử nghiệm, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R trong Bảng 3.

Bảng 3 – Dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng đối với citrinin

Mẫu	Mức nhiễm	Trung bình, $\bar{x}$ µg/kg	r µg/kg	R µg/kg
Gạo men đỏ (RYR)	Thấp	38,0	8,7	16,8
Gạo men đỏ	Cao	1 913	342	544
Bột mì	Thấp	31,1	6,6	12,3
Thực phẩm bổ sung - RYR (FS-RYR)	Thấp	22,1	7,7	15,4
Thực phẩm bổ sung - RYR	Cao	1 867	262	1 085
Lá bạch quả (GBL)	Thấp	30,2	7,8	21,0
Thực phẩm bổ sung - GBL (FS-GBL)	Thấp	21,7	8,9	22,7

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải tuân theo TCVN 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 và loại quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- d) ngày nhận mẫu;
- e) ngày thử nghiệm;
- f) các kết quả thử nghiệm và đơn vị biểu thị, khi cần thiết độ thu hồi phải được công bố cùng với các kết quả thử nghiệm và các kết quả thử nghiệm có được hiệu chỉnh với các độ thu hồi đó hay không;
- g) mọi đặc điểm cụ thể quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- h) 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 các điều kiện đối với hệ thống LC-MS/MS thích hợp

A.1 Cài đặt thiết bị sắc ký WATERS Acquity H-class kết hợp Xevo® TQ-S²⁾

Các cài đặt máy sắc ký nêu trong Bảng A.1 có thể được coi là các giá trị hướng dẫn. Các điều kiện sắc ký chính xác phụ thuộc vào phòng thử nghiệm và do đó có thể thay đổi nhẹ. Cần đảm bảo hệ thống phân tích thích hợp bằng cách đo các dung dịch chuẩn.

Bảng A.1 – Cài đặt thiết bị sắc ký

Hệ thống UHPLC	Acquity H-class (Waters kết hợp Xevo® TQ-S)		
Thể tích bơm	1 µL		
Cột	Cột Waters HSST3 C18 (cỡ hạt 1,8 µm, kích thước 2,1 mm x 100 mm) có tiền cột bảo vệ		
Tốc độ dòng	0,5 mL/min		
Nhiệt độ	40 °C		
Dung dịch rửa giải A	Nước + CH ₃ COOH 0,05 % (phần thể tích) + amoni acetat 5 mmol		
Dung dịch rửa giải B	Methanol + CH ₃ COOH 0,05 % (phần thể tích) + amoni acetat 5 mmol		
Gradient	Thời gian min	Dung dịch rửa giải A %	Dung dịch rửa giải B %
	0	70	30
	6,5	10	90
	8,0	0,0	100
	9,0	0,0	100
	10	70	30

Ví dụ về sắc ký đồ được nêu trong Phụ lục B.

A.2 Cài đặt detector khối phổ

Tất cả các thông số cài đặt detector sau đây có thể được coi là giá trị hướng dẫn. Các điều kiện đo chính xác phụ thuộc vào thiết bị tương ứng và do đó có thể thay đổi nhẹ. Cần đảm bảo hệ thống phân tích thích hợp bằng cách đo dung dịch chuẩn.

²⁾ Waters Acquity H-class kết hợp với Xevo TQ-S là ví dụ về sản phẩm được sử dụng 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.

- Nguồn ion: phun điện;
- Chế độ ion hóa: chế độ ion âm bằng chế độ theo dõi đa phản ứng (MRM);
- Cài đặt nguồn ion (ion hóa phun điện (ESI-));

Nhiệt độ nguồn	150 °C
Nhiệt độ khử dung môi	450 °C
Tốc độ dòng khí khử dung môi	1 000 L/h
Tốc độ dòng khí chạy qua cổng ion	150 L/h
Điện áp mao quản	100 kV
Thời gian quan sát (dwell time) cho tất cả các chuyển khối	0,038 s
Tốc độ dòng khí va chạm	0,15 mL/min
Áp suất phun	7,00 kPa

- Các dung dịch kiểm soát có thể đưa ra dữ liệu nêu trong Bảng A.2.

Bảng A.2 – Kết quả đo với dung dịch kiểm soát

Thông số	Giá trị kiểm tra
Thời gian lưu của citrinin	3,5 min đến 4,3 min
Mức độ nhiễm citrinin từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo	< 1 %
Tín hiệu/nhiều m/z 249	> 10
Độ rộng pic với citrinin 10 %	< 0,15 min
Áp suất tối đa gradient	< 100 MPa

Mức độ nhiễm từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo = “diện tích pic của dung dịch pha loãng”/“diện tích pic của dung dịch kiểm soát 1 ng/mL”.

Nếu mức độ nhiễm từ mẫu trước sang mẫu tiếp theo > 1 % thì:

- rửa bơm 10 lần;
- bơm từ 10 μ L đến 25 μ L để rửa kim bơm mẫu;
- rửa cột 30 min bằng 95 % pha động B ở tốc độ dòng 0,5 mL/min.

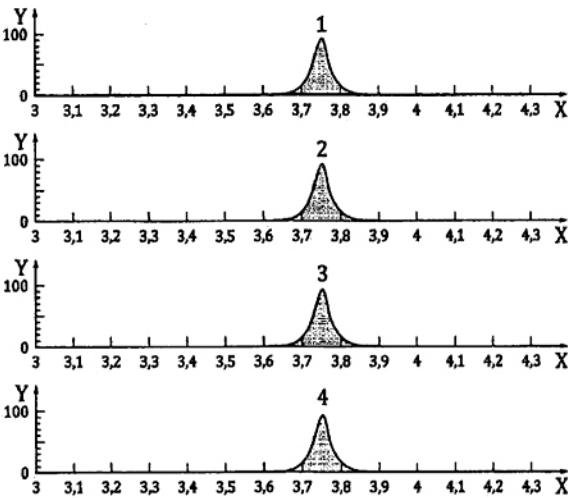
Phụ lục B

(tham khảo)

Sắc ký đồ điển hình

Trong các hình dưới đây, TargetLynx 4.1 (Waters)³⁾ đã được sử dụng để xử lý dữ liệu. Các kết quả được TargetLynx hiệu chỉnh tự động về hiệu ứng nền mẫu với chất nội chuẩn citrinin-¹³C và cho hệ số pha loãng $D = 5,0$ và tính hệ số pha loãng bổ sung (20 lần) để thu được hệ số pha loãng cuối cùng $D = 100$, khi cần.

Hình B.1 đến Hình B.5 thu được bằng cách cài đặt thiết bị theo Phụ lục A. Các hình cho thấy MRM chuẩn hóa đối với citrinin và citrinin-¹³C được phát hiện trong dung dịch kiểm soát và các dịch chiết mẫu được thêm chuẩn, FD-RYR, bột mì, GBL và FS-GBL. Chuyển khối định lượng và chuyển khối hằng định được đưa ra.

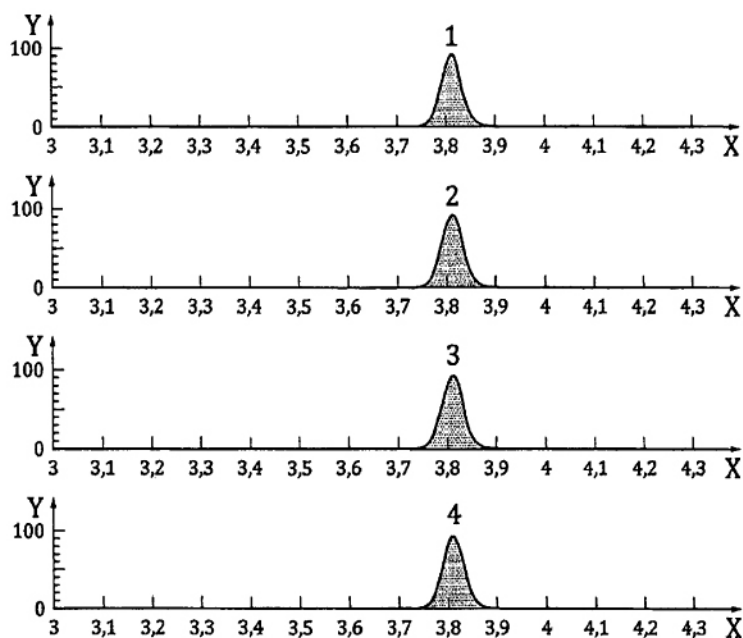


CHÚ DẪN

- | | |
|---|--|
| X | thời gian, tính bằng min |
| Y | độ đáp ứng của MS, % |
| 1 | MRM định lượng citrinin 281,0 → 249,0 |
| 2 | MRM định tính citrinin 281,0 → 205,0 |
| 3 | MRM định lượng citrinin có gắn ¹³ C 294,0 → 262,0 |
| 4 | MRM định tính citrinin 281,0 → 177,0 |

Hình B.1 – Ví dụ về sắc ký đồ MRM của dung dịch kiểm soát (25 ng/mL)

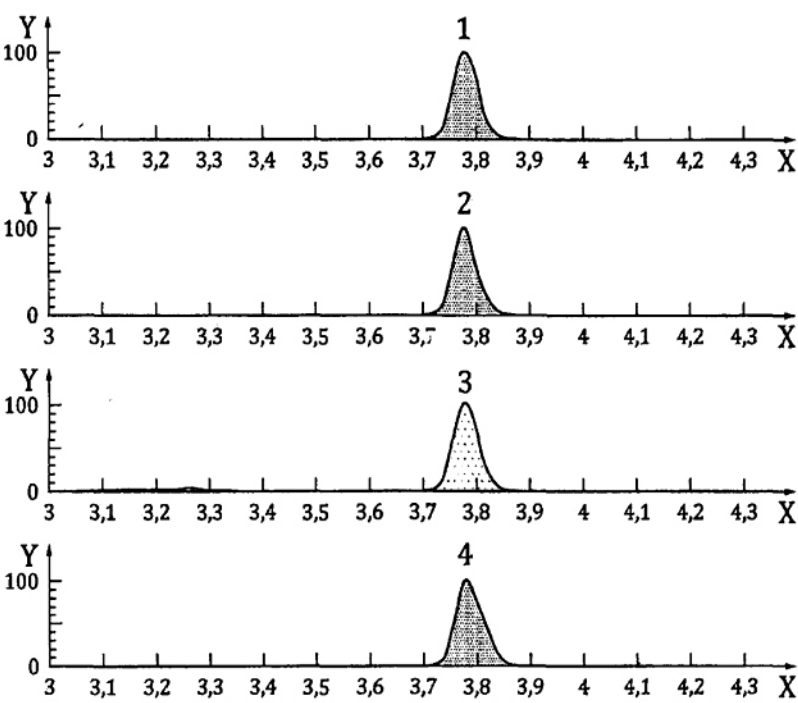
³⁾ TargetLynx 4.1 (Waters) là ví dụ về sản phẩm được sử dụng và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương..



CHÚ DẪN

- | | |
|---|--|
| X | thời gian, tính bằng min |
| Y | độ đáp ứng của MS, % |
| 1 | MRM định lượng citrinin 281,0 → 249,0 |
| 2 | MRM định tính citrinin 281,0 → 205,0 |
| 3 | MRM định lượng citrinin có gắn ^{13}C 294,0 → 262,0 |
| 4 | MRM định tính citrinin 281,0 → 177,0 |

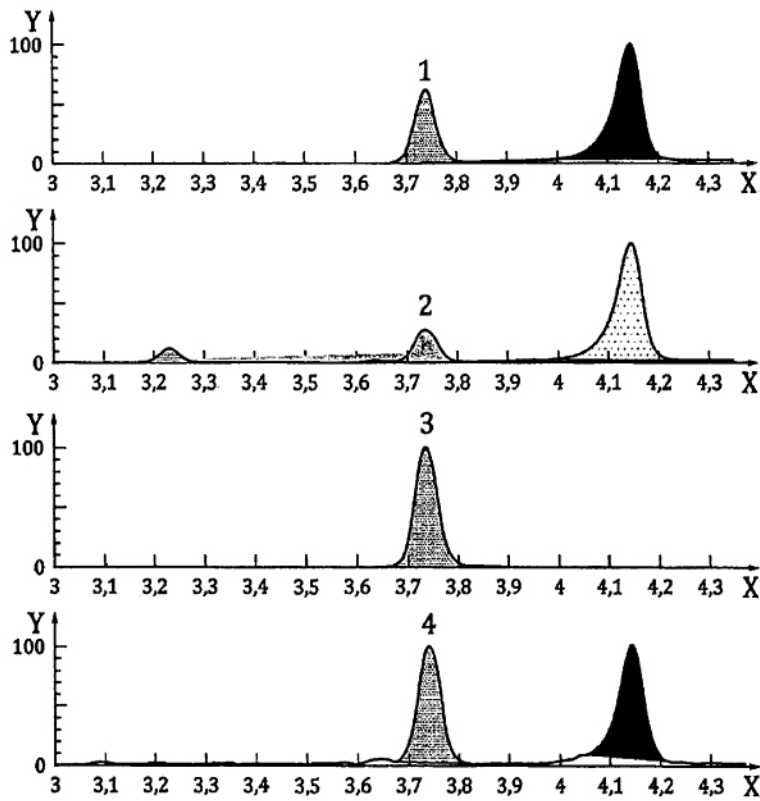
Hình B.2 – Ví dụ về sắc ký đồ MRM đối với citrinin trong mẫu trắng gạo men đỏ FS được thêm chuẩn ở mức 50 µg/kg



CHÚ DẪN

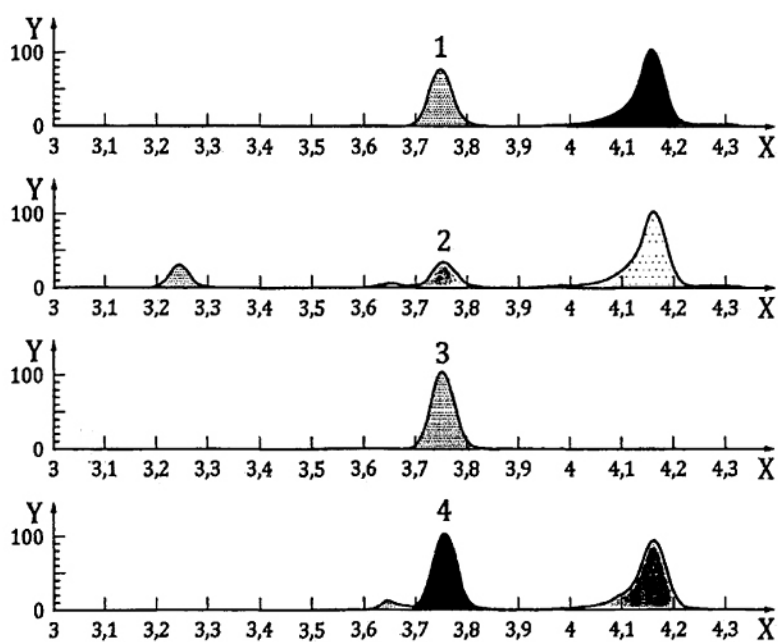
- X thời gian, tính bằng min
- Y độ đáp ứng của MS, %
- 1 MRM định lượng citrinin 281,0 → 249,0
- 2 MRM định tính citrinin 281,0 → 205,0
- 3 MRM định lượng citrinin có gắn ¹³C 294,0 → 262,0
- 4 MRM định tính citrinin 281,0 → 177,0

Hình B.3 – Ví dụ về sắc ký đồ MRM đối với citrinin trong mẫu trắng bột mì được thêm chuẩn ở mức 50 µg/kg

**CHÚ DẪN**

- X thời gian, tính bằng min
- Y độ đáp ứng của MS, %
- 1 MRM định lượng citrinin 281,0 → 249,0
- 2 MRM định tính citrinin 281,0 → 205,0
- 3 MRM định lượng citrinin có gắn ^{13}C 294,0 → 262,0
- 4 chất định tính citrinin MRM 281,0 → 177,0

Hình B.4 – Ví dụ về sắc ký đồ MRM đối với citrinin trong mẫu trắng lá bạch quả (GBL) được thêm chuẩn ở mức 20 µg/kg



CHÚ DẪN

- X thời gian, tính bằng min
- Y độ đáp ứng của MS, %
- 1 MRM định lượng citrinin 281,0 → 249,0
- 2 MRM định tính citrinin 281,0 → 205,0
- 3 MRM định lượng citrinin có gắn ¹³C 294,0 → 262,0
- 4 MRM định tính citrinin 281,0 → 177,0

Hình B.5 – Ví dụ về sắc ký đồ MRM đối với citrinin trong mẫu trắng FS-ginkgo biloba được thêm chuẩn ở mức 20 µg/kg

Phụ lục C

(tham khảo)

Dữ liệu độ chụm

Phương pháp này được xây dựng bởi phòng thử nghiệm “Chất độc và các chất tự nhiên” tại Viện Sciensano (Tervuren, Bỉ) trong khuôn khổ quy định Điều 11, CEN M/520 và được thử nghiệm trong thử nghiệm cộng tác vào năm 2016 với 18 phòng thử nghiệm sử dụng mẫu gạo men đỏ (RYR), bột mì, bột lá bạch quả (GBL), thực phẩm bổ sung gạo men đỏ và bột lá bạch quả bị ô nhiễm tự nhiên và được thêm chuẩn.

Dữ liệu nêu trong Bảng C.1, Bảng C.2 và Bảng C.3 thu được trong phép thử liên phòng thử nghiệm sử dụng LC-MS/MS. Các kết quả độ thu hồi thu được với các mẫu RYR, bột mì, GBL, thực phẩm bổ sung RYR hoặc GBL được thêm chuẩn.

Bảng C.1 – Dữ liệu độ chụm đối với gạo men đỏ và bột mì

	Gạo men đỏ			Bột mì	
	Mẫu trắng ^a	RYR- mức thấp	RYR- mức cao	Mẫu trắng ^a	Bột mì- mức thấp
Số kết quả báo cáo	17	18	17	17	18
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả định lượng	14	14	14	14	14
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	0	1	1	0	1
Số kết quả được chấp nhận	14	13	13	14	13
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, µg/kg	0,1	38,0	1 913	1,4	31,1
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , µg/kg	-	3,1	122	-	2,4
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối RSD_r , %	-	8,1	6,4	-	7,6
Giới hạn lặp lại, r , µg/kg	-	8,7	342	-	6,6
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , µg/kg	-	6,0	194	-	4,4
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R , %	-	15,8	10	-	14,1
Giới hạn tái lập, R , µg/kg	-	16,8	544	-	12,3
Độ thu hồi, %	-	80,8	-	-	89,8
Giá trị Horwitz-Thompson, µg/kg	-	8,4	278	-	6,9
Giá trị Horwitz-Thompson, % ^b	-	22,0	14,5	-	22,0
Giá trị HorRat	-	0,72	0,70	-	0,64
^a Trường hợp không có dữ liệu được đưa ra thì không thể tính toán thống kê.					
^b Được tính bằng cách sử dụng độ lệch chuẩn dự đoán từ phương trình Horwitz-Thompson.					

Bảng C.2 – Dữ liệu độ chụm đối với thực phẩm bổ sung gạo men đỏ

	Thực phẩm bổ sung RYR (FS-RYR)		
	Mẫu trắng ^a	FS-RYR-mức thấp	FS-RYR-mức cao
Số kết quả báo cáo	17	17	17
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả định lượng	14	14	14
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	0	1	0
Số kết quả được chấp nhận	14	13	14
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, µg/kg	0,0	22,1	1 867
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , µg/kg	-	2,8	94
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối RSD_r , %	-	12,5	5
Giới hạn lặp lại, r , µg/kg	-	7,7	262
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , µg/kg	-	5,4	388
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R , %	-	24,9	21
Giới hạn tái lập, R , µg/kg	-	15,4	1 085
Độ thu hồi, %	-	78,8	-
Giá trị Horwitz-Thompson, µg/kg	-	4,9	272
Giá trị Horwitz-Thompson, % ^b	-	22,0	14,6
Giá trị HorRat	-	1,13	1,43
^a Trường hợp không có dữ liệu được đưa ra thì không thể tính toán thống kê.			
^b Được tính bằng cách sử dụng độ lệch chuẩn dự đoán từ phương trình Horwitz-Thompson.			

Bảng C.3 – Dữ liệu độ chụm đối với bạch quả và thực phẩm bổ sung từ lá bạch quả

	Lá bạch quả (GBL)		Thực phẩm bổ sung-GBL	
	Mẫu trắng ^a	GBL-mức thấp	Mẫu trắng ^a	FS-GBL-mức cao
Số kết quả báo cáo	17	18	17	15
Số phòng thử nghiệm cung cấp kết quả định lượng	14	14	14	12
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	3	3	1	2
Số kết quả được chấp nhận	11	11	13	10
Giá trị trung bình, $\bar{x}$, $\mu\text{g/kg}$	0,1	30,2	0,0	21,7
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , $\mu\text{g/kg}$	-	2,8	-	3,2
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối RSD_r , %	-	9,2	-	14,6
Giới hạn lặp lại, r , $\mu\text{g/kg}$	-	7,8	-	8,9
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , $\mu\text{g/kg}$	-	7,5	-	8,1
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối RSD_R , %	-	24,9	-	37,3
Giới hạn tái lập, R , $\mu\text{g/kg}$	-	21,0	-	22,7
Độ thu hồi, %	-	74,9	-	69,2
Giá trị Horwitz-Thompson, $\mu\text{g/kg}$	-	6,6	-	4,8
Giá trị Horwitz-Thompson, % ^b	-	22,0	-	22,0
Giá trị HorRat	-	1,18	-	1,70
^a Trường hợp không có dữ liệu được đưa ra thì không thể tính toán thống kê.				
^b Được tính bằng cách sử dụng độ lệch chuẩn dự đoán từ phương trình Horwitz-Thompson.				

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN ISO/IEC 17025:2017, *Yêu cầu về năng lực của các phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*
- [2] TCVN 6910 (ISO 5725) (tất cả các phần), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo*
- [3] SANTE/12089/2016 Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed implemented by 001/01/2017. Available at:
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf
- [4] Commission regulation (EC) No 401/2006, of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 70, 12-34
- [5] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council, *Official Journal of the European Union* Corrigendum in L 136/3 of 29 May 2007 in its current version
- [6] Commission regulation (EU) No. 212/2014 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. *Official Journal of the European Union*, L 67, 3-4
- [7] Commission Regulation (EU) No. 519/2014 of 16 May 2014 in its latest version 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 or analysis. *Official Journal of the European Union*, L 147, 29-43
- [8] Reinhard H., Zimmerli B. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J. Chromatogr. A*. 1999, 862 (2) pp. 147-159