

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH AFLATOXIN TỔNG SỐ (B1, B2, G1, G2) SỬ DỤNG CỘT ÁI LỰC MIỄN DỊCH TRONG THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG HỆ THỐNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Dương Thị Thu Anh, Nguyễn Đức Hảo và Nguyễn Quang Huy

Phòng Phân tích thức ăn và Sản phẩm chăn nuôi - Viện Chăn nuôi

Tác giả liên hệ: Dương Thị Thu Anh. Tel: 0384436019. Email: thuanh.duong@gmail.com

TÓM TẮT

Kết quả ứng dụng phương pháp xác định hàm lượng Aflatoxin tổng số (B1, B2, G1, G2) trong thức ăn chăn nuôi bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đã xây dựng được đường chuẩn tuyến tính giữa nồng độ của các chất chuẩn Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) và diện tích peak của sắc ký đồ có hệ số tuyến tính R2 cao từ 0,99953 đến 1,00. Từ đó sử dụng đường chuẩn này để tính toán xác định hàm lượng Aflatoxin tổng số (B1, B2, G1, G2) trong 3 nhóm mẫu: Ngô hạt, thức ăn đậm đặc và thức ăn hỗn hợp cho lợn. Các mẫu này được lấy đại diện tại các cơ sở sản xuất thức ăn chăn nuôi ở Hưng Yên. Kết quả Aflatoxin tổng số (B1, B2, G1, G2) trong các mẫu này rất thấp và được sử dụng làm nền mẫu để xác định độ thu hồi bằng cách thêm chất chuẩn gốc Aflatoxin 2600 ppb. Độ thu hồi của chuẩn Aflatoxin tổng số trên các nền mẫu cao, được thực hiện bởi 2 kỹ thuật viên trong cùng khoảng thời gian, trên cùng một thiết bị phân tích và trên cùng nhóm mẫu. Kết quả độ thu hồi tương ứng trên 94,6% đối với nền mẫu ngô hạt, trên 83,76% đối với nền mẫu thức ăn hỗn hợp cho lợn và trên 87,43% đối với mẫu thức ăn đậm đặc cho lợn. Kết quả này khẳng định rằng quy trình phân tích Aflatoxin tổng số (B1, B2, G1, G2) trong thức ăn chăn nuôi có sử dụng cột ái lực miễn dịch bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đạt độ chính xác và phù hợp với trang thiết bị và kỹ năng phân tích ở Việt Nam.

Từ khóa: *Aflatoxin tổng số, Cột ái lực miễn dịch, HPLC*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đã là một trong những công cụ phân tích hiện đại trong hóa học phân tích và được ứng dụng trong nhiều ngành khoa học. Nó có khả năng tách, định danh và định lượng các hợp chất có mặt trong bất kỳ mẫu nào có thể hòa tan trong chất lỏng. Được phát minh ra từ năm 1952, hai nhà khoa học A.J.P Martin và R.L.Synge đã được trao giải thưởng Nobel cho lĩnh vực khoa học sắc ký và hiện nay các kỹ thuật sắc ký, đặc biệt là sắc ký lỏng hiệu năng cao luôn có vai trò quan trọng trong nghiên cứu lý thuyết cũng như ứng dụng của khoa học công nghệ. Ngày nay, các hợp chất có nồng độ vết như phần nghìn tỷ [ppt] có thể dễ dàng được phát hiện. HPLC có thể được áp dụng cho bất kỳ mẫu nào, chẳng hạn như dược phẩm, thực phẩm, chế phẩm dinh dưỡng, mỹ phẩm, môi trường, pháp y và hóa chất công nghiệp.

Aflatoxin là độc tố do vi nấm *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus* sinh ra. Nó được phát hiện vào năm 1960. Aflatoxin có 16 loại nhưng có 4 loại dẫn xuất quan trọng nhất, được quan tâm nhiều nhất và sớm nhất là: B1, B2, G1, G2, trong đó Aflatoxin B1 chiếm số lượng nhiều nhất trong nông sản và cũng gây tác hại nhiều nhất, gây ra ngộ độc mạnh nhất và cũng phổ biến nhất. Các loại nông sản dễ bị nhiễm Aflatoxin là hạt đậu phộng, bánh dầu phộng, tiếp đến là các loại ngô, các hạt đậu khác và bánh dầu của nó. Tiếp theo nữa là các loại hạt cốc và sản phẩm phụ của nó. Aflatoxin gây nên những tổn thương ở gan và có thể gây ung thư. Nó cũng làm giảm khả năng tiết sữa, đẻ trứng và sức đề kháng ở gia súc gia cầm (Mangan và Olsen, 2004). Vì vậy việc kiểm tra, phát hiện những thức ăn chăn nuôi bị nhiễm Aflatoxin là vô cùng quan trọng trong công tác kiểm tra, đánh giá chất lượng và an toàn thức ăn chăn nuôi. Hiện nay có nhiều phương pháp xác định hàm lượng Aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi trên máy

sắc ký lỏng hiệu năng cao như sử dụng cột tách chiết Mycosep #226, tuy nhiên phương pháp này có chi phí kiểm nghiệm cao nên phòng phân tích Viện Chăn nuôi đã ứng dụng một phương pháp mới của Mỹ để giảm bớt chi phí kiểm nghiệm là sử dụng cột ái lực miễn dịch để tách chiết Aflatoxin ra khỏi mẫu thức ăn và chạy trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector huỳnh quang.

Một quy trình phân tích phù hợp, chính xác thường được căn cứ vào kết quả của mẫu thu hồi chất cần phân tích bằng cách thêm chất chuẩn của chất đó vào nền mẫu thức ăn chăn nuôi và thực hiện xử lý mẫu từ công đoạn đầu tiên đến khi chạy ra kết quả trên máy HPLC để khẳng định toàn bộ quá trình phân tích từ việc cân trộn mẫu được đồng đều, đại diện đến việc tách chiết mẫu triệt để, lọc, ly tâm để chạy và tính toán chính xác trên máy HPLC. Tỷ lệ thu hồi này khẳng định tất cả các khâu của quy trình phân tích là hoàn toàn chính xác. Thông thường tỷ lệ thu hồi của các phương pháp sắc ký chấp nhận được từ 80% - 110%. Trong đề tài này, nồng độ chất chuẩn Aflatoxin được lựa chọn là nồng độ chuẩn gốc 2600 ppb, dựa trên cơ sở sự phân bố không đồng đều của Aflatoxin trong mẫu và phần thu được của kết quả phải tương đối cao (khoảng 80% - 90%).

Việc lấy mẫu và xử lý mẫu ngô và mẫu thức ăn hỗn hợp cho phân tích Aflatoxin phải đảm bảo đồng đều và đại diện cho toàn bộ mẫu. Bởi vì Aflatoxin không sẵn có trong mẫu mà do sự chuyển hóa thứ cấp của nấm mốc trong quá trình thu hoạch, vận chuyển và bảo quản và chế biến nông sản (CAST, 2003) và nấm mốc không phân bố đồng đều trên mẫu nên lượng mẫu cần lấy để phân tích phải tương đối lớn (khoảng 1-2 kg). Mẫu được nghiền qua mắt sàng 3mm bằng máy nghiền Brinkman Restch hoặc tương đương. Máy nghiền được vận hành với tốc độ ổn định. Các mẫu chưa nghiền đều được bảo quản ở nhiệt độ từ 20°C - 25°C, nơi khô ráo, thoáng mát. Mẫu đã nghiền được trộn thật đều bằng máy trộn Hobart hoặc tương đương trong 10 phút. Các dụng cụ tái sử dụng phải được làm sạch rất cẩn thận và được sấy khô ở nhiệt độ cao trước khi sử dụng. Việc chuẩn bị mẫu phải được đảm bảo an toàn cho người thực hiện. Các biện pháp an toàn được đảm bảo như đeo khẩu trang, găng tay, áo bảo hộ, đeo kính. Khi nghiền mẫu, xử lý mẫu được thực hiện trong tủ hút khí độc.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Loại mẫu: 3 nhóm mẫu: Ngô hạt, thức ăn đậm đặc và thức ăn hỗn hợp cho lợn

Thiết bị sử dụng

Cân phân tích (độ chính xác ~0.0001g)

Máy HPLC của hãng Water - Mỹ

Bộ quang hóa

Bộ giá đỡ ống chiết mẫu 6 vị trí có bơm chân không

Máy ly tâm

Máy Votex

Máy nghiền mẫu

Máy xay mẫu ướt

Bộ lọc dung môi có màng lọc nilong kích thước lỗ 0,45µm

Dụng cụ thí nghiệm

Cốc có mỏ thủy tinh 200 ml

Ống đong thủy tinh 50 ml

Bình bơm thể tích tự động 500 ml

Ống đong 500 ml

Bộ giá đỡ ống chiết mẫu 20ml, 6 vị trí có bơm chân không

Phễu lọc thủy tinh, đường kính 6,5 cm

Giấy lọc thủy tinh

Cột Afla Test mã 12022 cho HPL đầu dò huỳnh quang

Giấy lọc đường kính 11cm, kích thước lỗ 1.5 µm

Pipet tự động 1,0 ml và đầu hút phù hợp

Lọ đựng mẫu thủy tinh 2ml, có nắp

Giá để lọ đựng mẫu.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm: Phòng phân tích thức ăn và SPCN - Viện Chăn nuôi

Thời gian: Từ tháng 8 năm 2019 đến tháng 10 năm 2019.

Nội dung nghiên cứu

Xây dựng các đường chuẩn Aflatoxin ở các mức nồng độ chuẩn làm việc: 52ppb; 26 ppb; 2,6 ppb; 1,3 ppb và 0,52 ppb.

Aflatoxin 52 ppb (G₁=B₁ 20 ppb; G₂=B₂ 6 ppb)

Aflatoxin 26 ppb (G₁=B₁ 10 ppb; G₂=B₂ 3 ppb)

Aflatoxin 2,6 ppb (G₁=B₁ 1 ppb; G₂=B₂ 0,3 ppb)

Aflatoxin 13 ppb (G₁=B₁ 5 ppb; G₂=B₂ 1,5 ppb)

Aflatoxin 1,3 ppb (G₁=B₁ 0,5 ppb; G₂=B₂ 0,15 ppb)

Aflatoxin 0,52 ppb (G₁=B₁ 0,2 ppb; G₂=B₂ 0,06 ppb)

Xác định hàm lượng Aflatoxin trong các mẫu

Xác định độ thu hồi ở 3 nền mẫu ở mức nồng độ chuẩn gốc thêm vào là 2600 ppb

Kết quả tham gia chương trình thử nghiệm thành thạo (PT) của Mỹ về chỉ tiêu Aflatoxin (B₁, B₂, G₁, G₂)

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp lấy mẫu: Thực hiện theo tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 4325:2007

Mẫu thức ăn được lấy đại diện cho lô mẫu. Lấy ở ít nhất 5 điểm khác nhau và trộn đều. Khối lượng cuối cùng của mẫu là 2 kg

Phương pháp xử lý mẫu:

Cân khoảng 50g±1g mẫu đại diện cho vào cốc thủy tinh 250 ml, thêm 5 g NaCl

Thêm 100 ml dung dịch Methanol/H₂O (tỷ lệ 4:1), đồng nhất trên máy xay uớt

Lọc bằng giấy lọc lấy 10 ml dịch lọc + 40 ml H₂O, lắc đều và lọc bằng giấy lọc thủy tinh lấy 10 ml dịch lọc

Hấp thu qua cột Aflatest

Rửa giải bằng 1 ml MeOH. Thêm 1 ml H₂O cất. Lắc đều và chạy trên hệ thống HPLC

Phương pháp phân tích mẫu

Sử dụng các loại hóa chất:

Methanol: Loại dùng cho HPLC

Chất chuẩn gốc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 2600 ppb: Bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C. Dung dịch này bền trong 12 tháng.

Dung dịch chuẩn trung gian Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 260 ppb: Hút 100 µl dung dịch chuẩn gốc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 2600 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 900 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Dung dịch chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2): Chuẩn bị thang dung dịch chuẩn Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) nồng độ lần lượt là 0,52; 1,30; 2,60; 13,00; 26,00 và 52 ppb bằng cách:

Chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 52 ppb: Hút 200 µl dung dịch chuẩn trung gian Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 260 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 800 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 26 ppb: Hút 100 µl dung dịch chuẩn trung gian Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 260 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 900 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 13 ppb: Hút 50 µl dung dịch chuẩn trung gian Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 260 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 950 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 2,6 ppb: Hút 100 µl dung dịch chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 26 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 900 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 1,3 ppb: Hút 50 µl dung dịch chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 26 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 950 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 0,52 ppb: Hút 20 µl dung dịch chuẩn làm việc Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) 26 ppb vào lọ nâu 1,5 ml, thêm tiếp 980 µl methanol, lắc đều. Dung dịch này được chuẩn bị trước khi sử dụng và tránh ánh sáng.

Nước cất dùng cho HPLC

Sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) của hãng Water để phân tích mẫu. Hệ thống này bao gồm:

Bình chứa dung môi pha động, bình chứa dung dịch rửa cột

Bộ phận khử khí

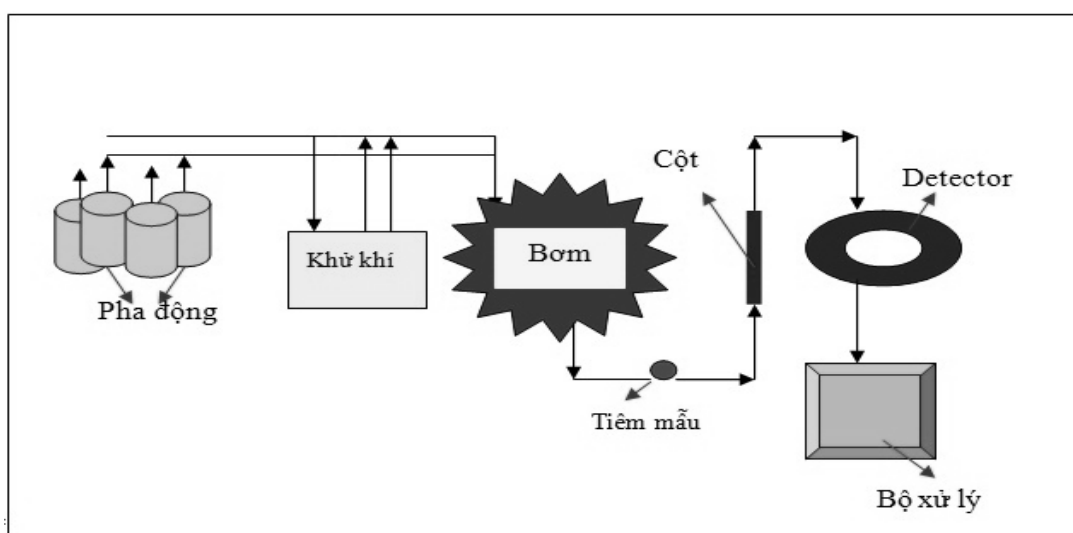
Bơm cao áp

Bộ phận lấy mẫu tự động

Cột sắc ký

Detector

Bộ phận máy tính gắn phần mềm nhận tín hiệu, xử lý số liệu và điều khiển hệ thống HPLC trong Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ hệ thống HPLC

Chế độ chạy sắc ký theo phương pháp của phòng thí nghiệm công ty Water- Mỹ năm 2018:

Bơm cao áp: Tốc độ dòng 1,0 ml/phút

Lượng mẫu tiêm vào hệ thống: 20 μ l

Cột chạy sắc ký: Cột Water Nova pak- C18; 15cm x 4,6mm; 5 μ m

Detector: Huỳnh quang : Bước sóng kích thích 360 nm

Bước sóng phát xạ: 440 nm

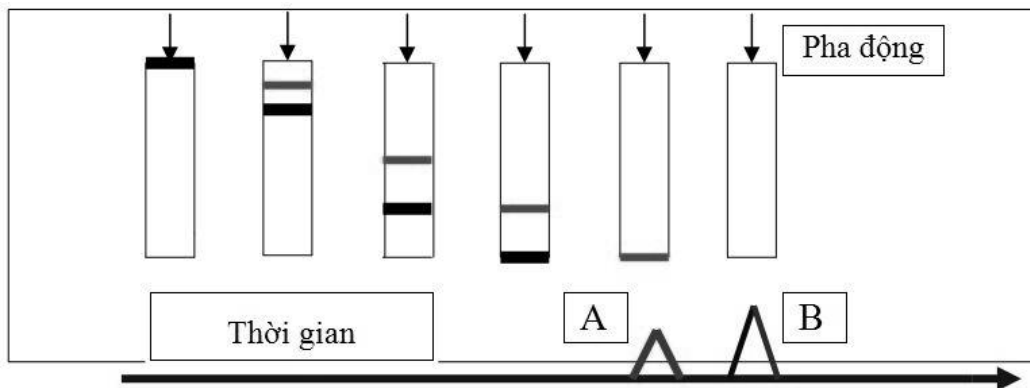
Pha động: 450 ml methanol + 550 ml nước cất.

Thời gian chạy: 14 phút/ mẫu

Chương trình chạy mẫu được khuyến cáo như sau :

Mẫu chuẩn/Dung dịch pha loãng mẫu/Mẫu thu hồi/Mẫu thử nghiệm/Mẫu chuẩn

Sơ đồ tách Aflatoxin theo thời gian: Hình 2.



Hình 2. Sơ đồ tách Aflatoxin

Phương pháp tính toán kết quả: Xây dựng đường chuẩn của từng loại Aflatoxin dựa trên quan hệ tuyến tính giữa diện tích của peak sắc ký và nồng độ đã biết của từng chất chuẩn. Trên cơ sở phương trình đường chuẩn của từng chất, tính toán kết quả của mẫu cần phân tích theo công thức:

$$Y = m X$$

Trong đó:

X: Nồng độ của từng Aflatoxin

Y: Diện tích peak của từng Aflatoxin

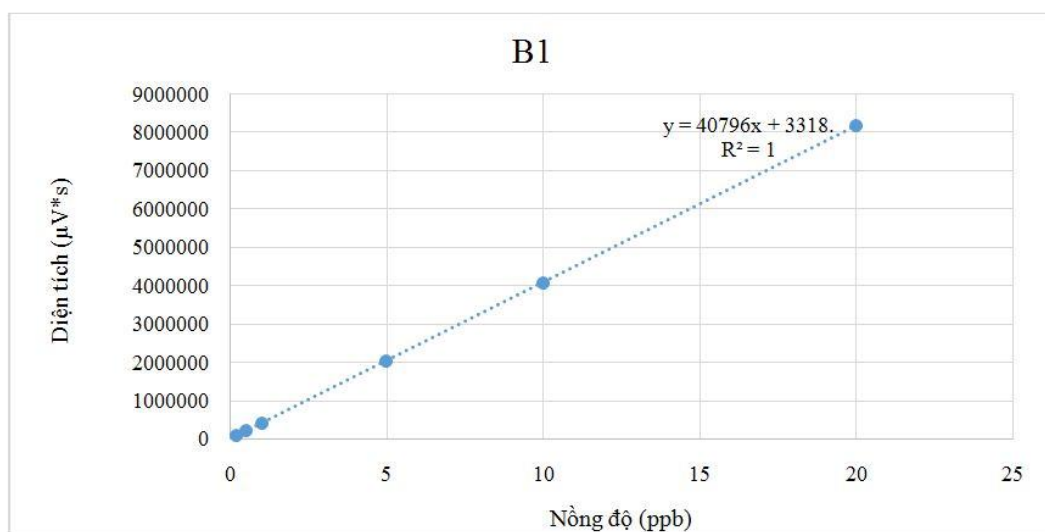
m: Hệ số góc của đường chuẩn

Xử lý số liệu

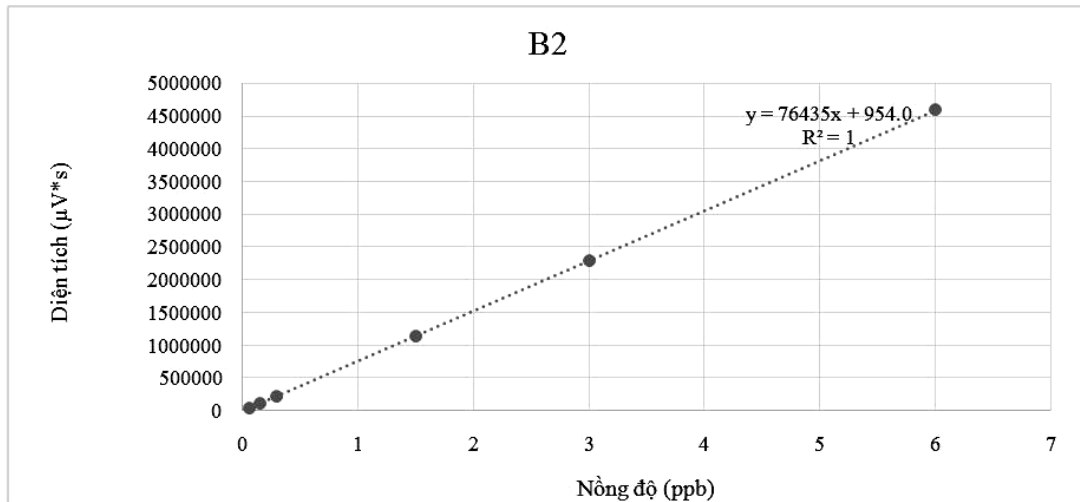
Các số liệu thu thập được xử lý trên Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

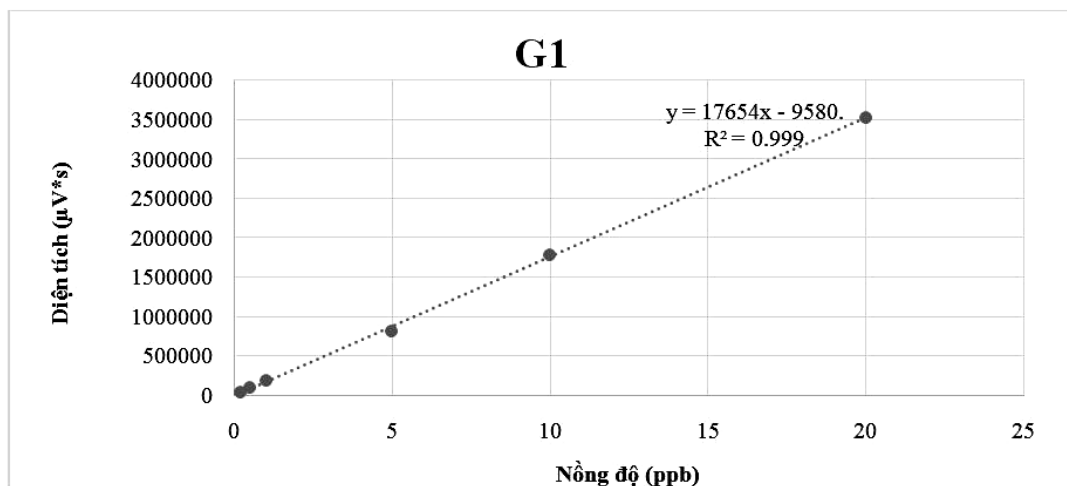
Xây dựng các đường chuẩn của từng loại Aflatoxin



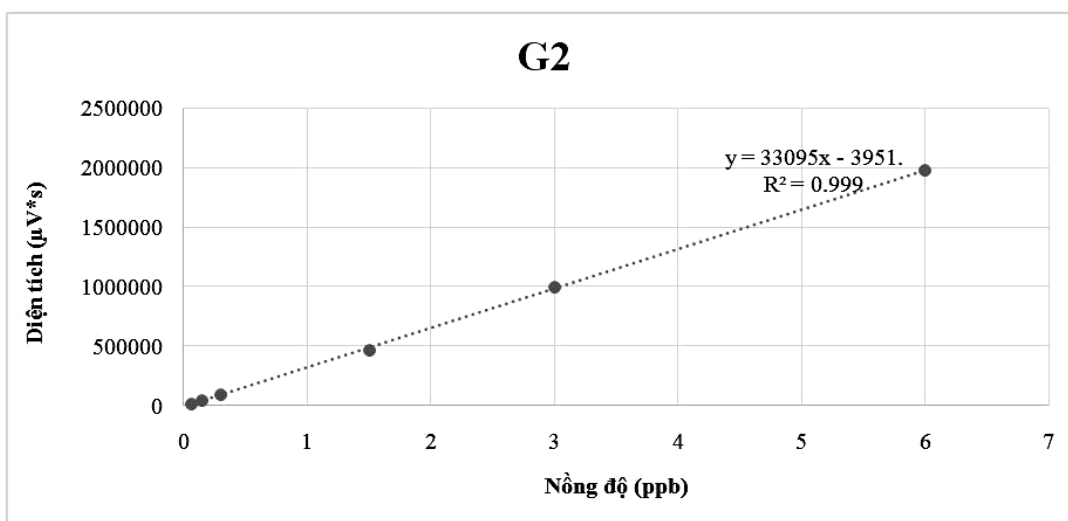
Hình 3. Đồ thị đường chuẩn Aflatoxin B1



Hình 4. Đồ thị đường chuẩn Aflatoxin B2



Hình 5. Đồ thị đường chuẩn Aflatoxin G1



Hình 6. Đồ thị đường chuẩn Aflatoxin G2

Đồ thị đường chuẩn của 6 loại nồng độ của từng loại Aflatoxin đạt độ tuyến tính cao, với hệ số tuyến tính $R \approx 1$, chứng tỏ rằng sự tương quan giữa nồng độ chất chuẩn và diện tích peak chuẩn trên sắc ký là rất chính xác. Đây là cơ sở để tính toán kết quả chính xác của các Aflatoxin trong mẫu phân tích.

Kết quả phân tích hàm lượng Aflatoxin trong các mẫu thức ăn lấy trên thị trường

Các mẫu thức ăn chăn nuôi được lấy ngẫu nhiên trên thị trường là 3 nhóm mẫu: Ngô hạt, thức ăn đậm đặc và thức ăn hỗn hợp cho lợn, được lấy của các công ty chuyên sản xuất thức ăn chăn nuôi.

Các mẫu được xử lý theo đúng quy trình, được nghiền nhỏ, tách chiết, hấp thu qua cột, rửa giải pha loãng và cuối cùng được lọc và bơm vào hệ thống HPLC. Mỗi mẫu được phân tích lặp lại 7 lần. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân tích Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trong các loại mẫu khác nhau

TT	Loại mẫu thức ăn	n	Kết quả (ppb) (Mean±SE)	CV (%)
1	Mẫu ngô	7	0,68±0,002	0,86
2	Mẫu thức ăn đậm đặc	7	0,29±0,006	5,07
3	Mẫu thức ăn hỗn hợp	7	0,00	0,00

Qua Bảng 1 cho thấy, kết quả phân tích của Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) trong 3 loại mẫu có kết quả không cao, so với QCVN và TCVN về giới hạn an toàn trong ngô, thức ăn đậm đặc và thức ăn hỗn hợp cho lợn; điều đó có thể khẳng định việc thu hoạch và bảo quản các sản phẩm nông nghiệp được làm rất tốt để ngăn ngừa các độc tố nấm mốc sinh ra các Aflatoxin trong các mẫu thức ăn chăn nuôi. Độ lặp lại của các mẫu rất tốt, có hệ số biến thiên nhỏ ($CV < 5,1\%$), chứng tỏ quy trình rất ổn định và các thao tác của thử nghiệm viên rất thành thạo.

Xác định độ thu hồi của Aflatoxin tổng số chuẩn ở nồng độ 2600 ppb được thêm vào 3 nền mẫu khác nhau (Ngô, thức ăn đậm đặc, thức ăn hỗn hợp cho lợn)

Chuẩn bị mẫu cho việc thu hồi bằng cách thêm vào 50g mẫu từng loại thức ăn đối chứng 200 µl dung dịch chất chuẩn Aflatoxin tổng số có nồng độ 2600ppb. Lặp lại 7 lần, trên 3 loại nền mẫu như trên. Tiếp tục thực hiện quá trình tách chiết mẫu theo quy trình và chạy mẫu trên HPLC. Kết quả độ thu hồi được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thu hồi của các nền mẫu khác nhau

TT	Loại mẫu thức ăn	n	Tỷ lệ thu hồi (%)	CV (%)
1	Mẫu ngô	7	94,60±2,43	6,8
2	Mẫu thức ăn đậm đặc	7	87,43±0,21	1,92
3	Mẫu thức ăn hỗn hợp	7	83,76±0,93	2,93

Kết quả Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy, độ thu hồi của các mẫu thức ăn được bổ sung thêm chất chuẩn đều có độ thu hồi cao từ trên 83%, hệ số CV thấp ($< 7\%$) là hoàn toàn đạt yêu cầu đối với phép phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. Độ thu hồi cao còn phụ thuộc vào loại nền mẫu thức ăn chăn nuôi. Nền mẫu đồng nhất thì dễ dàng tách chiết hơn so với các nền mẫu có thành phần phức tạp, do đó tỷ lệ hồi cũng cao hơn, đây là lý do giải thích vì sao ngô có độ thu

hồi cao hơn thức ăn đậm đặc và thức ăn hỗn hợp cho lợn con. Quy trình ứng dụng này đã tách chiết được tương đối triệt để Aflatoxin tổng số được bổ sung vào trong thức ăn và đã xác định được chính xác hàm lượng của nó trong mẫu thức ăn cho chăn nuôi trên hệ thống HPLC. Như vậy quy trình này đã ứng dụng thành công tại phòng thí nghiệm Viện Chăn nuôi, phù hợp với các điều kiện cần thiết để thực hiện quy trình, trên thiết bị phân tích HPLC và con người thực hiện tại Viện Chăn nuôi.

So sánh kết quả phân tích Aflatoxin tổng số trong chương trình thử nghiệm thành thạo (PT) của Mỹ

Chương trình được tổ chức bởi Hiệp hội các nhà hóa học ở bang Texas - Mỹ vào tháng 1 năm 2020, trong chương trình kiểm soát và thử nghiệm thành thạo Aflatoxin trong nghiên cứu nông nghiệp. Số lượng phòng thí nghiệm (PTN) tham gia là 137 phòng trên thế giới, nên kết quả chương trình có độ tin cậy cao, phản ánh đúng năng lực của các PTN tham gia. Các kết quả được nhận xét, phân tích lỗi thông qua việc thực hiện nội dung chương trình khi thông báo đến các PTN tham gia sẽ là cơ sở để có thể kịp thời chấn chỉnh lại quy trình thí nghiệm và có biện pháp phòng ngừa thích hợp (nếu có). Các phân tích kết quả trong chương trình cũng cho thấy bức tranh thực trạng về tính chuyên nghiệp, năng lực và trình độ của các phòng thí nghiệm tham gia chương trình PT.

Mỗi phòng thí nghiệm tham gia chương trình được tính toán chỉ số đánh giá sự thành thạo z score cho từng kết quả thử nghiệm. Chỉ số z-score được xác định theo công thức: trình bày lại công thức:

$$z = \frac{x - X}{\sigma}$$

Trong đó:

x - Kết quả phân tích của các phòng thí nghiệm;

X - Giá trị ấn định;

σ - Độ lệch chuẩn;

z (z-score) - Chỉ số đánh giá sự thành thạo.

Kết quả số lạc: $z \geq 3$

Kết quả nghi ngờ: $2 < z < 3$

Kết quả đạt: $z \leq 2$

Bảng 3. Kết quả tham gia chương trình PT - Mỹ tháng 1 năm 2020

TT	Chỉ tiêu phân tích	Kết quả của chương trình (ppb)	Kết quả của Viện Chăn nuôi (ppb)	Hệ số z
1	Aflatoxin tổng số	277,00±53,80	212,80	-1,19
2	Aflatoxin B1	229,00±45,70	179,83	-1,07

Qua bảng kết quả trên cho thấy, hệ số z - score của kết quả phân tích cả 2 chỉ tiêu Aflatoxin B1 và Aflatoxin tổng số của Viện Chăn nuôi đều nhỏ hơn 2. Điều đó khẳng định rằng sự thành thạo của PTN Viện Chăn nuôi về 2 chỉ tiêu này đã đạt yêu cầu và được thế giới thừa

nhận. Đảm bảo kỹ thuật cao về quy trình tách chiết, thiết bị hiện đại chính xác, tay nghề thành thạo.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Xây dựng được các đường chuẩn tuyến tính của từng loại Aflatoxin với hệ số tuyến tính R^2 cao từ 0,99953 - 1 ở các mức nồng độ chuẩn là:

Aflatoxin 52 ppb ($G_1=B_1$ 20 ppb; $G_2=B_2$ 6 ppb)

Aflatoxin 26 ppb ($G_1=B_1$ 10 ppb; $G_2=B_2$ 3 ppb)

Aflatoxin 2,6 ppb ($G_1=B_1$ 1 ppb; $G_2=B_2$ 0,3 ppb)

Aflatoxin 13 ppb ($G_1=B_1$ 5 ppb; $G_2=B_2$ 1,5 ppb)

Aflatoxin 1,3 ppb ($G_1=B_1$ 0,5 ppb; $G_2=B_2$ 0,15 ppb)

Aflatoxin 0,52 ppb ($G_1=B_1$ 0,2 ppb; $G_2=B_2$ 0,06 ppb)

Xác định được hàm lượng Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) của 3 loại nền mẫu thức ăn chăn nuôi khác nhau được lấy ngẫu nhiên trên thị trường. Các kết quả đều có độ chính xác cao.

Xác định được độ thu hồi vào 3 nền mẫu được thêm chuẩn Aflatoxin tổng số ở mức nồng độ 2600 ppb có độ thu hồi cao, được thực hiện trên các thử nghiệm viên trên cùng một hệ thống HPLC trên 83%, phù hợp với yêu cầu đối với phương pháp phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Nền mẫu ngô: Thu hồi 94,6%

Nền mẫu thức ăn đậm đặc cho lợn: Thu hồi 87,43%

Nền mẫu thức ăn hỗn hợp cho lợn: Thu hồi 83,76%

Điều này chứng tỏ rằng quy trình phân tích xác định hàm lượng Aflatoxin (B1, B2, G1, G2) có sử dụng cột ái lực miễn dịch phù hợp với trang thiết bị, kỹ năng phân tích ở Việt Nam.

Kết quả so sánh với chương trình thử nghiệm thành thạo do Mỹ tổ chức vào tháng 1 năm 2020 đạt kết quả tốt với chỉ số đánh giá sự thành thạo của phòng thí nghiệm z-score < 2 với hệ số z là -1,17 và -1,19 với Aflatoxin tổng số và Aflatoxin B1.

Đề nghị

Đề nghị được ứng dụng phát triển nhiều quy trình phân tích các chỉ tiêu khác về an toàn thức ăn chăn nuôi trên thiết bị phân tích hiện đại tại phòng thí nghiệm Phân tích Thức ăn và Sản phẩm chăn nuôi - Viện Chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật. 2010. Thảm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật. Trường đại học đực Hà Nội, 2006. Hóa học phân tích II.

Tiếng nước ngoài

CAST. 2003. Mycotoxin. Risks in plant, animal, and human system. In: Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology: Ames, Iowa. P4

Mangan, N. and Olsen, M. 2004. Mycotoxin in food - Detection and control. Woodhead and CRC Press LLC, 2004, Woodhead Publishing Ltd.

Faithful, N. T. 2002. Methods in agricultural chemical analysis. A practical handbook.

Instruction manual Aflatest HPLC # 715001733 Rev B

Leo M.L Nollet. Food analysis by HPLC.

ABSTRACT

Application of total Aflatoxin content (B1, B2, G1, G2) determination method by immunoaffinity column on high-performance liquid chromatography (HPLC)

The results from applying the method of determining the total Aflatoxin content (B1, B2, G1, G2) in animal feeds using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) have built a linear calibration curve between concentration of Aflatoxin standards (B1, B2, G1, G2) and the peak area of chromatograms with a high linear coefficient R^2 from 0.99953 to 1.00. Since then, the use of this calibration curve to calculate and determine the total Aflatoxin content (B1, B2, G1, G2) in 3 sample groups: corn grain, feed concentrate and feed mixture for pigs. These samples were representative of the animal feed production facilities in Hung Yen. The total Aflatoxin content results (B1, B2, G1, G2) in these samples were very low and were used as base samples to determine the recovery by adding the Aflatoxin standard stock 2600 ppb. The recovery of total Aflatoxin standard on sample bases was high, which was performed by two technicians in the same time period, on the same analyzer and on the same sample group. The results of the corresponding recovery were 94.60% for corn grain base samples, 83.76% for feed mixture base samples for pigs and 87.43% for feed concentrate. These results confirmed that the total Aflatoxin content analysis procedure (B1, B2, G1, G2) in animal feeds using the immunoaffinity column on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was accurate and consistent with analytical equipment and skills in Vietnam.

Keywords: *total Aflatoxin content, immunoaffinity column, HPLC.*

Ngày nhận bài: 26/4/2020

Ngày phản biện đánh giá: 06/5/2020

Ngày chấp nhận đăng: 28/5/2020

Người phản biện: *TS. Trần Thị Bích Ngọc*