



HỘI KHOA HỌC KỸ THUẬT PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC VIỆT NAM
VIETNAM ANALYTICAL SCIENCES SOCIETY

ISSN - 0868 - 3224

Tạp chí
PHÂN TÍCH HÓA , LÝ VÀ SINH HỌC
Journal of Analytical Sciences

TẠP CHÍ PHÂN TÍCH HÓA, LÝ VÀ SINH HỌC

Tạp chí
PHÂN TÍCH
HÓA , LÝ VÀ SINH HỌC
Journal of Analytical Sciences

T - 27

Số 2

2022

In 500 cuốn, khổ 19 x 27 cm. Giấy phép xuất bản số 445/GP-BTTTT cấp ngày 24/9/2016.
Chỉ số: ISN 0868 - 3224. In xong và nộp lưu chiểu tháng 12 năm 2022

HA NOI

THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH AFLATOXIN B1, B2, G1, G2 TRONG BẮP BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG ĐẦU DÒ HUỖNH QUANG UPLC-FLD VÀ KHẢO SÁT MỘT SỐ MẪU BẮP VÀ SẢN PHẨM TỪ BẮP TRÊN ĐỊA BÀN TPHCM

Đến tòa soạn 10-3-2022

Nguyễn Thành Duy*, Nguyễn Thuý Ngân Hà, Đặng Thị Kim Hằng, Nguyễn Lâm Kiều Diễm,
Lý Tuấn Kiệt, Nguyễn Quốc Hùng, Lê Thành Thọ

Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TP.HCM

Chu Văn Hải

Sở Khoa Học và Công Nghệ TP.HCM

Nguyễn Quang Trung

Viện Hàn Lâm và Khoa học Việt Nam

SUMMARY

Nghiên cứu này đã thực hiện xác nhận đầy đủ các thông số phê duyệt theo tiêu chuẩn ISO 17025: 2017 và khảo sát một số mẫu thực tế tại một số chợ trên địa bàn TPHCM. Mẫu được chiết và làm sạch bằng cột ái lực miễn dịch IAC, sau đó dịch chiết được phân tích bằng thiết bị sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang UPLC-FLD, không sử dụng dẫn xuất trước và sau cột. Kết quả thẩm định với độ chọn lọc tối ưu, hệ số bình phương tuyến tính $R^2 > 0,9998$, giới hạn phát hiện và định lượng lần lượt thấp hơn 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ và 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ cho từng aflatoxin B1, B2, G1, G2, độ lệch chuẩn tương đối $\text{RSD} < 7\%$, độ thu hồi 71,8-99,9 %, độ ổn định rất tốt trong khoảng 21 ngày ở các điều kiện lưu mẫu khác nhau. Ngoài ra, phân tích 50 mẫu bắp và các sản phẩm từ bắp cho thấy có 14 mẫu nhiễm aflatoxin với hàm lượng 0,44-198 $\mu\text{g kg}^{-1}$, chiếm tỷ lệ 28% số mẫu phân tích trong đó có 12 mẫu nhiễm aflatoxin B1 vượt mức tối đa cho phép 2 $\mu\text{g/kg}$ và có 8 mẫu vượt ngưỡng tổng aflatoxin cho phép 4 $\mu\text{g/kg}$ theo mức tối đa cho phép của quy chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT.

Từ khóa: Aflatoxin, UPLC, fluorescence detection, post-column, derivatization, liquid chromatography mass spectrometry

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Aflatoxin là một chất gây ung thư mạnh và có thể ảnh hưởng đến tất cả các cơ quan nội tạng, đặc biệt là gan và thận; và có liên quan đến các loại ung thư khác. Aflatoxin B1 được biết là nguyên nhân gây ung thư ở người; aflatoxin sẽ gây ra ung thư gan khi cơ thể con người có dấu hiệu bị nhiễm Virus viêm gan B (HBV)[1]. Chính vì thế, một phương pháp phân tích đáng tin cậy cho phép xác định hàm lượng aflatoxin trong thực phẩm là rất cần thiết.

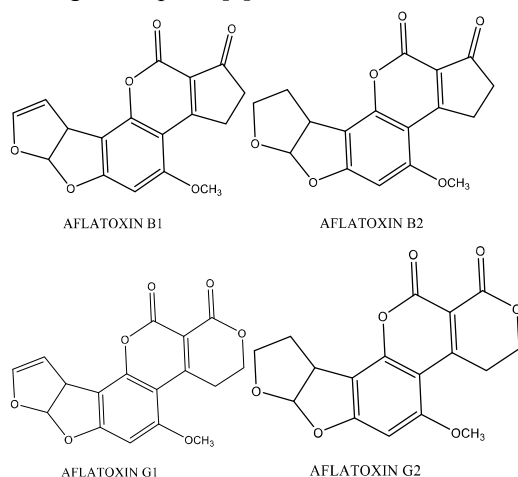
Các aflatoxin thường nhiễm trên các loại nông sản thực phẩm. Hiện nay người ta đã tìm thấy khoảng 17 loại aflatoxin khác nhau: B1,

B2, B2a, B3, G1, G2, G2a, M1, M2, P1, Q1, R0, RB1, RB2, L, LH, LM. Tuy nhiên có 4 loại chính thường gặp nhất gồm 4 hợp chất của nhóm bis-furanocoumarin, là sản phẩm trao đổi chất tạo bởi nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus*, được đặt tên là B1, B2, G1, G2. Bốn chất được phân biệt trên cơ sở màu phát quang của chúng. Kí hiệu “B” là chữ viết tắt của Blue (màu xanh dương) dưới tia UV và chữ G là chữ viết tắt của Green (màu xanh lá cây)[2].

Aflatoxin G1 có cấu trúc rất gần với cấu trúc aflatoxin B1 (Hình 1): nó có hai chức lacton, còn aflatoxin B1 chỉ có một. Bằng cách hydro

khử nối đôi trong nhân hidrofuran tận cùng của aflatoxin B1 và G1 ta thu được hai sản phẩm độc khác là aflatoxin B2 và G2. Carnaghan đã tìm thấy dẫn xuất hydroxy của aflatoxin B1, B2 trong sữa bò và thịt bò được gọi là aflatoxin M1 và aflatoxin M2 (M là một chữ viết tắt của Milk). aflatoxin M1 và aflatoxin M2 có huỳnh quang màu xanh tím [2].

Trong bốn loại aflatoxin thì aflatoxin B1 thường được tìm thấy ở nồng độ cao nhất, tiếp theo là G1, trong khi đó B2 và G2 tồn tại ở nồng độ thấp hơn[2].



Hình 1. Công thức cấu tạo các aflatoxin B1, B2, G1, G2

Bắp là một trong những nông sản được tiêu thụ rộng rãi ở Việt Nam, một nước nhiệt đới gió mùa, với điều kiện mưa nhiều, độ ẩm cao, là điều kiện lý tưởng cho việc sản sinh nấm mốc aflatoxin.

Tại Việt Nam, Bộ Y tế qui định giới hạn cho phép tối đa (ML) aflatoxin tổng là 4 µg/kg và aflatoxin B1 là 2 µg/kg trong bắp[3].

Trong nghiên cứu này chúng tôi thẩm định quy trình xác định đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong bắp trên hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD), không sử dụng dẫn xuất trước và sau cột phân tích. Dựa vào kết quả thẩm định phương pháp, chúng tôi thực hiện khảo sát một số mẫu bắp và sản phẩm từ bắp tại một số chợ trên địa bàn TPHCM.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu bắp hạt khô, bắp hạt đóng lon, bắp rang bơ, bắp rang gia vị, các loại snack bắp được mua ngẫu nhiên từ các chợ trên địa bàn TPHCM.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

2.2.1.1. Thiết bị, dụng cụ

- Thiết bị sử dụng là đầu dò huỳnh quang của hãng Waters.
- Cột phân tích BEH C₁₈ 1,7 µm (2,1 x 150 mm).
- Các dụng cụ và thiết bị phụ trợ khác trong phòng thí nghiệm.

2.2.1.2. Hóa chất

- Acetonitrile (ACN), Methanol (MeOH), Acid Formic (HCOOH) loại HPLC với độ tinh khiết ≥ 99,9 %, Sodium chloride NaCl với độ tinh khiết ≥ 99 %, Nước cất 2 lần loại ion, Phosphate Buffered Saline pH 7.4 (PBS)
- Cột ái lực miễn dịch Aflatoxin thể tích cột 3mL (IAC- AflaTest WB)
- Chuẩn hỗn hợp Aflatoxin: B1: 2 µg/mL; B2: 0.5 µg/mL; G1: 2 µg/mL; G2: 0.5 µg/mL trong dung môi Acetonitrile.

2.2.2. Tiến hành

2.2.2.1. Chuẩn bị chất chuẩn

- Các chuẩn trung gian nồng độ 500 µg/L, 50 µg/L được pha từ chuẩn gốc nồng độ 5 µg/mL dung môi acetonitril (ACN). Chuẩn gốc và trung gian lưu trữ ở nhiệt độ 2-8 °C sử dụng trong 12 tháng và 6 tháng.
- Chuẩn làm việc được xây dựng 5 điểm chuẩn làm việc 0.5; 5.0; 10.0; 20.0; 50.0 µg/L trong 0.2% HCOOH /ACN (1/1).

2.2.2.2. Xử lý mẫu

Mẫu bắp được mua về từ các chợ trên địa bàn TPHCM, tiến hành đồng nhất mẫu và được lưu ở nhiệt độ -20 °C nếu chưa phân tích. Cân chính xác 5,0 g bắp xay cho vào ống ly tâm định mức 20 mL ACN/H₂O = 6/4 (v/v). Đánh trong bể siêu âm 30 phút để trích ly, ly tâm 9000 vòng trên phút. Lọc qua giấy lọc Ω 110 mm, rút 5 mL dịch lọc ly tâm thêm với 20 mL nước cất 2 lần loại Ion. Đánh Vortex 1 phút, ly tâm lần 2 với 9000 vòng trên phút. Lọc qua giấy lọc Ω 110 mm, rút 20 mL dịch ly tâm qua cột ái lực miễn dịch. Rửa tạp bằng 20 mL nước

cất 2 lần loại Ion. Rửa giải bằng 3 mL MeOH, thổi khô, sau đó định mức 1,0 mL dung dịch ACN/HCOOH (0,2 %) = 1/1 (v/v), đánh vortex. Lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm trước khi tiêm vào hệ UPLC-FD.

2.2.2.3. Điều kiện sắc ký

- Pha động 0.1% HCOOH/ACN/MeOH (64/18/18).
- Tốc độ dòng 0,2 mL/phút
- Nhiệt độ cột phân tích là 40 °C
- Thể tích tiêm 5 µL.
- Thông số đầu dò fluorescences FLD với bước sóng kích thích $\lambda_{\text{Ex}} = 365 \text{ nm}$ và bước sóng phát xạ $\lambda_{\text{Em}} = 455 \text{ nm}$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng nền mẫu

Để khảo sát ảnh hưởng của nền mẫu, tiến hành dựng đường chuẩn trên dung môi và trên nền

mẫu bắp để đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu dựa vào hệ số góc của phương trình đường chuẩn. Tiêu chí đánh giá dựa vào %ME [4].

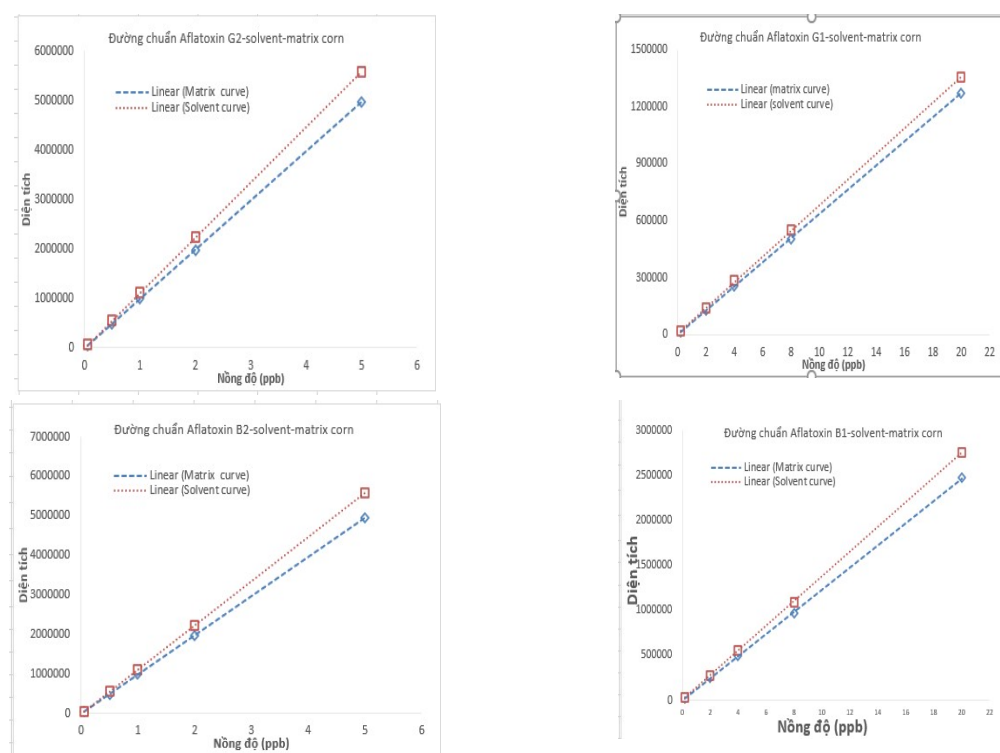
$$\%ME = (\text{Slope}_{\text{matrix}} / \text{Slope}_{\text{solvent}} - 1) \times 100$$

Khi $|ME| > 50\%$: Ảnh hưởng lớn nền mẫu xảy ra.

Khi $20\% < |ME| \leq 50\%$: Ảnh hưởng nền mẫu trung bình.

Khi $|ME| \leq 20\%$: Xem như không ảnh hưởng nền mẫu.

Kết quả thu được từ bảng 1 cho thấy $|ME| \leq 22$. Phương pháp xử lý mẫu không ảnh hưởng bởi nền mẫu vì thể đường chuẩn dung dịch được sử dụng để thẩm định quy trình này giảm công sức, cũng như giảm lượng chuẩn khi phải xây dựng chuẩn trên mẫu.



Hình 2. Đường chuẩn các aflatoxin B1, B2, G1, G2 trên dung dịch và trên nền mẫu bắp

Bảng 1. Phương trình đường chuẩn trên dung dịch và trên nền mẫu bắp hạt

Chất phân tích	Phương trình đường chuẩn		%ME
	Dung môi	Nền bắp	
Aflatoxin B1	$Y = 1.38e+005X - 3.04e+003$	$Y = 1.23e+005X - 3.66e+003$	10,9
Aflatoxin B2	$Y = 1.31e+006X - 1.34e+004$	$Y = 1.20e+006X - 4.12e+003$	8,4
Aflatoxin G1	$Y = 6.75e+004X + 8.32e+003$	$Y = 6.34e+004X + 5.37e+002$	6,1
Aflatoxin G2	$Y = 1.12e+006X - 4.74e+003$	$Y = 9.93e+005X - 5.04e+003$	11,3

3.2. Thẩm định phương pháp

3.2.1. Đường chuẩn

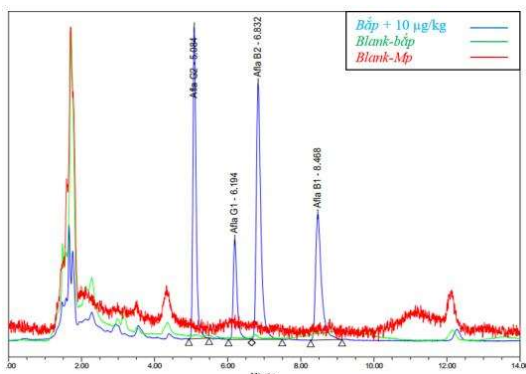
Tiến hành xây dựng đường chuẩn trên dung dịch trong khoảng tuyến tính 0,5-50 µg/L. Các đường chuẩn được đánh giá dựa vào tiêu chí hệ số tương quan, $R^2 \geq 0,99$ (xem hình 2). Nồng độ tính toán được trên từng điểm chuẩn không lệch quá 15% so với giá trị thực, ngoại trừ nồng độ tại điểm MQL không vượt quá 20%[5].

3.2.2. Độ chọn lọc

Tiến hành phân tích 6 mẫu bắp khác nhau được mua từ các chợ trên địa bàn TPHCM, tiến hành phân tích theo quy trình 2.2.2.2 (mẫu trắng), dung dịch chuẩn và mẫu thêm chuẩn.

Theo quy định mẫu trắng phải không có tín hiệu chất phân tích. Trong khi đó, dung dịch chuẩn và mẫu thêm chuẩn có tín hiệu chất phân tích và cùng thời gian lưu với nhau [6].

Phương pháp có tính chọn lọc vì khi so sánh 3 sắc ký đồ (blank pha động, mẫu trắng, mẫu thêm chuẩn 10 µg/kg), tại thời gian lưu của các chất Aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện nhiễu gây ra do thành phần nền mẫu gây ra.



Hình 3. Sắc ký đồ overlay blank-Mp, blank-bắp, bắp + 10 µg/kg

3.2.3. Độ thu hồi, độ lặp lại, độ tái lập và độ không đảm bảo đo

Độ lặp lại của phương pháp được thể hiện thông qua độ lệch chuẩn lặp lại (RSD_r), còn độ tái lập được đánh giá thông qua độ lệch chuẩn tái lập (RSD_R) của các kết quả nghiên cứu ở hai ngày thực hiện phân tích khác nhau ở 3 mức nồng độ tại giới hạn định lượng, mức nồng độ tại giới hạn cho phép tối đa aflatoxin B1 (ML =2 µg/kg) và mức nồng độ 10xML.

Kết quả thu được từ bảng 2, độ thu hồi từ 71,8 - 99,9 %, độ lặp lại (% RSD_r) đạt 0,1-6,8 %, độ tái lập (% RSD_R) đạt 0,4 – 7,0 % đáp ứng tiêu chí chấp nhận theo AOAC 2016 [7].

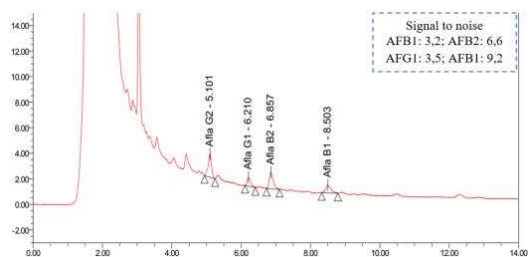
Bảng 2. Kết quả độ thu hồi, độ lặp lại và độ tái lập, độ không đảm bảo đo.

Chất phân tích	Nồng độ thêm mẫu (µg/kg)	Hiệu suất thu hồi (%) n = 12	RSD_r (%) n = 6	RSD_R (%) n = 12	Độ không đảm bảo đo U_{exp} (%)
AFB1	0,3	82,8	6,8	7,0	30,8
	2	81,1	0,9	1,1	
	20	97,9	0,7	0,8	
AFB2	0,075	85,7	3,4	4,2	25,6
	0,5	82,6	0,3	0,5	
	5	99,6	0,3	0,5	
AFG1	0,3	73,5	1,5	4,2	37,8
	2	82,2	1,0	1,9	
	20	99,2	0,4	0,5	
AFG2	0,075	71,8	1,0	1,9	37,4
	0,5	82,0	0,4	1,5	
	5	99,9	0,1	0,4	

3.2.4. Giới hạn định lượng

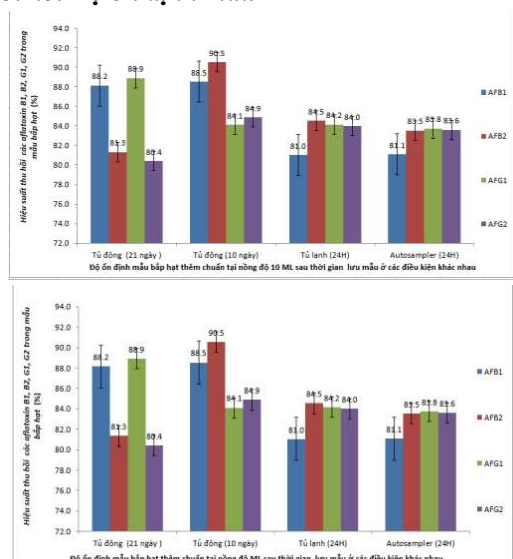
Theo SANCO/12682/2019[8], MQL là nồng độ thêm chuẩn ở nồng độ nhỏ nhất mà phương pháp có thể xác định với độ lặp lại, độ tái lập nhỏ hơn 20 %, hiệu suất thu hồi đạt từ 70 – 120 %. Giới hạn phát hiện MDL = MQL/3. Kiểm tra lại MDL bằng cách thêm chuẩn vào mẫu trắng tại nồng độ phát hiện, xác định dựa vào tỉ lệ tín hiệu chia cho nhiễu của đường nền ($S/N = \text{signal/noise} \geq 3$).

Trong phần nghiên cứu này, mẫu trắng được xác định mục 3.2.2, thêm chuẩn ở nồng độ 0,75 ppb và 0,25 ppb để xác định giá trị MQL và MDL. Kết quả phân tích từ bảng 2 thu được tất cả các chất đều có hiệu suất thu hồi trên 80 %, độ tái lập nhỏ hơn 20 %. Như vậy, MQL của phương pháp đối với nền mẫu bắp lần lượt là AFB1: 0,3; AFB2: 0,075; AFG1: 0,3; AFG2: 0,075 µg/kg và giới hạn phát hiện MDL lần lượt là AFB1: 0,1; AFB2: 0,0125; AFG1: 0,1; AFG2 0,0125 µg/kg.



Hình 4. Sắc ký đồ giới hạn phát hiện trong bắp

3.2.5. Độ ổn định mẫu



Hình 5. Biểu đồ hiệu suất thu hồi các aflatoxin ở các mức nồng độ ML, 10ML lưu ở các điều kiện khác nhau

Tiến hành thực hiện 3 mẫu thêm chuẩn ở từng mức nồng độ ML, 10xML, mỗi mức nồng độ thực hiện 3 mẫu và lưu mẫu ở những điều kiện nhiệt độ, thời gian khác nhau như sau:

- Mẫu thêm chuẩn đã xử lý theo quy trình 2.2.2.2 và lưu trong bộ tiêm mẫu tự động trong 24 giờ (Autosampler 24H)
- Mẫu thêm chuẩn đã xử lý theo quy trình 2.2.2.2 và lưu trong tủ lạnh (4°C) trong 24 giờ (Tủ lạnh 24H)
- Mẫu thêm chuẩn chưa xử lý và lưu tủ đông (-20°C) trong 10 ngày, sau đó lấy ra xử lý theo quy trình 2.2.2.2 (Tủ đông 10 ngày)
- Mẫu thêm chuẩn chưa xử lý lưu tủ đông (-20°C) trong 21 ngày, sau đó lấy ra xử lý theo quy trình 2.2.2.2 (Tủ đông 21 ngày)

Kết quả hình 5 cho thấy các aflatoxin ổn định trong nền bắp hạt ở điều kiện lưu mẫu ở nhiệt độ -20°C trong 21 ngày. Vì thế, khi mua mẫu từ các chợ, nếu chưa phân tích kịp thời, mẫu có

thể được lưu trữ trong ngăn đông ở nhiệt độ $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

3.3. Kết quả phân tích mẫu bắp và sản phẩm từ bắp tại các chợ trên địa bàn TPHCM

Sau khi thẩm định, phương pháp phân tích được áp dụng để phân tích Aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong bắp và sản phẩm từ bắp được mua ngẫu nhiên từ các chợ trên địa bàn TPHCM. Kết quả phân tích 50 mẫu bao gồm bắp hạt khô, bắp hạt đóng lon, bắp rang bơ, bắp rang gia vị, các loại snack bắp từ tháng 11-12/2021 cho thấy có 14 mẫu nhiễm aflatoxin với hàm lượng 0,44-198 $\mu\text{g/kg}$, chiếm tỷ lệ 28% số mẫu phân tích trong đó có 12 mẫu nhiễm aflatoxin B1 vượt mức tối đa cho phép 2 $\mu\text{g/kg}$ từ 1,56-88 lần và có 8 mẫu vượt ngưỡng hàm lượng aflatoxin cho phép tổng aflatoxin là 4 $\mu\text{g/kg}$ từ 1,25- 49,5 lần.

Trong số 14 mẫu nhiễm aflatoxin có 12 mẫu phát hiện thấy aflatoxin B2 (0,33-19,5 $\mu\text{g/kg}$), 5 mẫu phát hiện thấy aflatoxin G1 (0,45-3,77 $\mu\text{g/kg}$), không có mẫu phát hiện thấy aflatoxin G2, các mẫu còn lại không phát hiện thấy aflatoxin trong mẫu với giới hạn định lượng $\text{MQL} = 0,3 \mu\text{g/kg}$.

4. KẾT LUẬN

Đã thẩm định quy trình phân tích đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong bắp trên hệ thống sắc ký lỏng siêu hiệu năng đầu dò huỳnh quang (UPLC-FLD), không sử dụng dẫn xuất với đầy đủ các thông số thẩm định đáp ứng theo yêu cầu ISO 17025:2017, kết quả thu được với độ chọn lọc tối ưu, hệ số hồi quy tuyến tính $R^2 > 0.9999$, độ lặp lại và độ tái lập rất tốt với $\text{RSD} < 7\%$ và hiệu suất thu hồi từ 71,8-99,9% đạt theo tiêu chí chấp nhận theo tiêu chuẩn AOAC 2016.

Phương pháp đáp ứng mức giới hạn cho phép aflatoxin tối đa ML trong bắp theo QCVN 8-1:2011/BYT với giới hạn phát hiện lần lượt là AFB1: 0,1; AFB2: 0,0125; AFG1: 0,1; AFG2 0,0125 $\mu\text{g/kg}$ và giới hạn định lượng của phương pháp đối với nền mẫu bắp lần lượt là AFB1: 0,3; AFB2: 0,075; AFG1: 0,3; AFG2: 0,075 $\mu\text{g/kg}$.

Kết quả phân tích 50 mẫu bắp và sản phẩm từ

bắp bao gồm bắp hạt khô, bắp hạt đóng lon, bắp rang bơ, bắp rang gia vị, các loại snack bắp trong khoảng thời gian tháng 11-12/2021 tại một số chợ trên địa bàn TPHCM cho thấy có 14 mẫu nhiễm aflatoxin, chiếm tỷ lệ 28% số mẫu phân tích.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ TPHCM (mã số đề tài 48/2020/HĐ-QPTKHCN). Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TPHCM đã hỗ trợ một phần nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO, "Aflatoxins pose a serious health risk to humans and livestock". 2018: Department of Food Safety and Zoonoses.
2. Đào Thùy Dương, "Nghiên cứu thực trạng nhiễm độc tố Aflatoxin trong một số loại nông sản thực phẩm tại khu vực miền núi phía Bắc và biện pháp xử lý", Luận Văn Thạc sĩ công nghệ sinh học, Trường đại học Thái Nguyên, 2014.
3. Quy chuẩn Việt Nam QCVN 8-1:2011/BYT, "Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm". 2011: Hà Nội.
4. Chawla, S., et al., Evaluation of Matrix Effects in Multiresidue Analysis of Pesticide Residues in Vegetables and Spices by LC-

MS/MS. J AOAC Int, 2017. 100(3): p. 616-623.

5. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>, "Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry" 2018.

6. Guidance_SANTE_2019_12682, "Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed". 2020.

7. AOAC INTERNATIONAL, "Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements" 2016.

8. SANTE/12682/2019, "Main changes introduced in Document N° SANTE/12682/2019 with respect to the previous version (Document N° SANTE/11813/2017)". 2019.

9. Mark E. Benvenuti, Alice J. Di Gioia, "Rapid analysis of aflatoxins without derivatization using ultra performance liquid chromatography and fluorescence detection", Application, Waters.