

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10638:2014

EN 14123:2003

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AFLATOXIN B₁
VÀ TỔNG AFLATOXIN B₁, B₂, G₁, G₂ TRONG LẠC, QUẢ HỒ
TRẦN, QUẢ VỎ VÀ BỘT ỚT – PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
LỎNG HIỆU NĂNG CAO CÓ TẠO DẪN XUẤT SAU CỘT VÀ
LÀM SẠCH BẰNG CỘT ÁI LỰC MIỄN NHIỄM**

*Foodstuffs – Determination of aflatoxin B₁, and the sum of
aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts, pistachios, figs, and paprika powder –
High performance liquid chromatographic method with post-column derivatization
and immunoaffinity column clean-up*

HÀ NỘI - 2014

Lời nói đầu

TCVN 10638:2014 hoàn toàn tương đương với EN 14123:2003;

TCVN10638:2014 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thực phẩm - Xác định hàm lượng aflatoxin B₁ và tổng aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ trong lạc, quả hồ trăn, quả vả và bột ớt - Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao có tạo dẫn xuất sau cột và làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm

Foodstuffs – Determination of aflatoxin B₁ and the sum of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanuts, pistachios, figs, and paprika powder – High performance liquid chromatographic method with post-column derivatization and immunoaffinity column clean-up

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không thể đưa ra được tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng để xác định các aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ trong quả vả, quả hồ trăn, quả lạc và bột ớt. Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,8 ng/g đối với từng loại aflatoxin hoặc tốt hơn (các giá trị nhận được từ nghiên cứu liên phòng và nội phòng thí nghiệm), tùy thuộc vào thiết bị sử dụng.

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 Nguyên tắc

Phân mẫu thử được chiết bằng dung môi (metanol/nước) hoặc dung môi có thêm hexan (hoặc xyclohexan). Dịch chiết mẫu được lọc, pha loãng với dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) rồi đưa lên cột ái lực miễn nhiễm (IAC) chứa các kháng thể đặc hiệu đối với từng loại aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂. Các aflatoxin được rửa giải ra khỏi cột ái lực miễn nhiễm bằng metanol. Định lượng các aflatoxin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo (RP-HPLC) có tạo dẫn xuất sau cột (PCD) bằng brom hóa sau đó bằng detector huỳnh quang. Cũng có thể tạo dẫn xuất sau cột bằng brom được tổng hợp bằng phương pháp điện hóa hoặc bằng pyridini hydrobromua perbromua (PBPB).

4 Thuốc thử

4.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước loại 3 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987) trừ khi có quy định khác.

4.2 Dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS)

Hòa tan 0,20 g kali clorua, 0,20 g kali dihydro phosphat, 1,16 g dinatri hydro ortophosphat (hoặc 2,92 g hydrophosphat ngậm 12 phân tử H₂O) và 8,00 g natri clorua trong 0,9 lít nước. Sau khi hòa tan, chỉnh pH đến 7,4 bằng HCl (0,1 mol/l) hoặc NaOH (0,1 mol/l) một cách thích hợp. Thêm nước đến 1 lít.

Có thể sử dụng các viên muối đệm phosphat có bán sẵn trên thị trường có các đặc tính tương tự.

4.3 Natri clorua.

4.4 Pyridini hydrobromua perbromua (PBPB), [CAS:39416-48-3].

4.5 Kali bromua.

4.6 Axetonitril, loại dùng cho HPLC.

4.7 Metanol, loại dùng cho HPLC.

4.8 Metanol, loại kỹ thuật.

4.9 Toluên.

4.10 Hỗn hợp dung môi metanol và nước

Trộn 8 thể tích metanol (4.8) với 2 thể tích nước.

4.11 n-Hexan, xyclohexan, loại kỹ thuật.

4.12 Axit nitric, $c(\text{HNO}_3) = 4 \text{ mol/l}$.

4.13 Cột ái lực miễn nhiễm

Cột ái lực chứa các kháng thể có thể hấp thu các aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂. Cột có khả năng tách tối đa không nhỏ hơn 100 ng và có độ thu hồi không nhỏ hơn 80 % đối với các aflatoxin B₁, B₂, G₁ và không nhỏ hơn 60 % đối với aflatoxin G₂ khi sử dụng dung dịch chuẩn nước (10 % metanol) chứa 5 ng mỗi loại độc tố. Nồng độ dung môi tối đa của các dung dịch đưa lên cột không được quá 12 % metanol.

4.14 Dung môi pha động HPLC (A), sử dụng với PBPB

Trộn 6 thể tích nước với 2 thể tích axetonitril (4.6) và 3 thể tích metanol (4.7). Khử khí của dung dịch trước khi sử dụng. Pha động không được chứa hạt và phải được lọc trước khi sử dụng.

4.15 Dung môi pha động HPLC (B), sử dụng với brom được tổng hợp bằng phương pháp điện hóa

Trộn 6 thể tích nước với 2 thể tích axetonitril (4.6) và 3 thể tích metanol (4.7). Thêm 120 mg kali bromua (4.5) và 350 µl axit nitric (4.12) trên lít pha động. Khử khí của dung dịch trước khi sử dụng.

4.16 Thuốc thử sau cột

Hòa tan 50 mg PBPB (4.4) trong 1 lít nước. Dung dịch này có thể sử dụng trong 4 ngày nếu được bảo quản ở nhiệt độ phòng để ở nơi tối.

4.17 Hỗn hợp toluen và axetonitril

Trộn 98 thể tích toluen (4.9) với 2 thể tích axetonitril (4.6).

4.18 Aflatoxin, dạng tinh thể hoặc dạng màng mỏng trong ampun hoặc ở dạng dung dịch aflatoxin bán sẵn trên thị trường.

CẢNH BÁO 1 – Các quy trình khử nhiễm đối với chất thải aflatoxin phòng thử nghiệm do Cơ quan nghiên cứu quốc tế về ung thư (IRAC) [1], [2] xây dựng.

CẢNH BÁO 2 – Các aflatoxin dễ bị phân hủy bởi ánh sáng. Nơi phân tích aflatoxin trong phòng thử nghiệm phải tránh ánh sáng ban ngày. Có thể sử dụng màng mỏng hấp thụ tia cực tím (UV) để che các cửa sổ kết hợp với ánh sáng dịu (không phải ánh sáng trực tiếp mặt trời) hoặc dùng rèm cửa hoặc màn che kết hợp với ánh sáng nhân tạo (có thể sử dụng đèn ống huỳnh quang).

Bảo vệ các dung dịch chứa aflatoxin càng tránh ánh sáng càng tốt (giữ ở nơi tối, sử dụng màng nhôm hoặc thủy tinh màu hổ phách) và bảo quản ở nhiệt độ theo khuyến cáo của nhà sản xuất (ví dụ – 18 °C).

4.19 Dung dịch gốc aflatoxin

Hòa tan từng aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ trong hỗn hợp toluen và axetonitril (4.17) để thu được các dung dịch có nồng độ 10 µg/ml đối với từng loại aflatoxin. Bọc các bình kín trong màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C.

TCVN 10638:2014

Để xác định nồng độ chính xác các aflatoxin trong từng dung dịch gốc, ghi lại đường hấp thụ của các dung dịch ở bước sóng từ 330 nm đến 370 nm trong cuvet thủy tinh thạch anh 1 cm của máy đo phổ, dùng hỗn hợp toluen và axetonitril (4.17) trong cuvet so sánh. Tính nồng độ khối lượng của từng aflatoxin, ρ_i , bằng microgam trên mililit, sử dụng công thức (1):

$$\rho_i = \frac{A_{\max} \times M_i \times 100}{\varepsilon_i \times d} \quad (1)$$

Trong đó:

$A_{\max}$ là độ hấp thụ xác định được ở điểm hấp thụ cực đại trên đường hấp thụ;

M_i là khối lượng phân tử của từng aflatoxin, tính bằng gam trên mol (g/mol);

ε_i là khả năng hấp thụ phân tử của từng aflatoxin trong hỗn hợp của toluen và axetonitril (4.17), tính bằng mét vuông trên mol (m^2/mol);

d là chiều dài đường quang của cuvet, tính bằng xentimet (cm).

M_i và ε_i của aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ được nêu trong Bảng 1.

Bảng 1 – Khối lượng phân tử và độ hấp thụ phân tử của các aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂

[trong hỗn hợp của toluen và axetonitril (4.17)]

Aflatoxin	M_i (g/mol)	ε_i (m^2/mol)
B ₁	312	1930
B ₂	314	2040
G ₁	328	1660
G ₂	330	1790

4.20 Dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp

Chuẩn bị dung dịch gốc các aflatoxin hỗn hợp chứa nồng độ aflatoxin B₁ và G₁ 1 000 ng/ml, aflatoxin B₂ và G₂ 200 ng/ml trong hỗn hợp của toluen và axetonitril (4.17) bằng cách pha loãng các dung dịch gốc aflatoxin (B₁, B₂, G₁ và G₂) (4.19).

Dùng pipet lấy chính xác 2,0 ml dung dịch này cho vào bình định mức 20 ml (5.10) đã hiệu chuẩn, thêm hỗn hợp toluen và axetonitril (4.17) đến vạch, trộn kỹ để thu được dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp đã pha loãng chứa nồng độ aflatoxin B₁ và G₁ 100 ng/ml, aflatoxin B₂ và G₂ 20 ng/ml.

Bọc kín bình trong màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C. Trước khi sử dụng, không mở bình cho đến khi lượng chứa trong bình đạt đến nhiệt độ phòng để tránh hấp thụ nước do ngưng tụ.

4.21 Dung dịch chuẩn aflatoxin hỗn hợp

Dùng pipet lấy các thể tích nêu trong Bảng 2 dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp đã pha loãng chứa 100 ng/ml aflatoxin B₁ và G₁, 20 ng/ml aflatoxin B₂ và G₂ (xem 4.20) cho vào một dãy các bình định mức 10 ml (5.10). Làm bay hơi dung dịch toluen/axetonitril đến khô bằng dòng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Thêm 4 ml metanol vào từng bình để các aflatoxin hòa tan, thêm nước đến 10 ml và lắc kỹ.

Khi trộn metanol và nước dễ bị ngót thể tích, vì vậy điều chỉnh lại thể tích đến thể tích quy định.

Bảng 2 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn aflatoxin hỗn hợp

Dung dịch chuẩn	Lấy từ dung dịch gốc đã pha loãng (4.20) (μ l)	Nồng độ khối lượng của dung dịch chuẩn (ng/ml)			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
1	40	0,400	0,080	0,400	0,080
2	120	1,200	0,240	1,200	0,240
3	200	2,000	0,400	2,000	0,400
4	280	2,800	0,560	2,800	0,560
5	360	3,600	0,720	3,600	0,720

4.22 Dung dịch thêm chuẩn

Chuẩn bị dung dịch thêm chuẩn bằng cách dùng pipet lấy 2 ml dung dịch gốc aflatoxin hỗn hợp (chứa nồng độ aflatoxin B₁ và G₁ 1000 ng/ml, aflatoxin B₂ và G₂ 200 ng/ml, xem 4.20) cho vào bình định mức 10 ml đã hiệu chuẩn. Làm bay hơi dung dịch toluen/axetonitril đến khô bằng dòng khí nitơ ở nhiệt độ phòng. Thêm metanol đến vạch và trộn kỹ. Nồng độ của dung dịch thêm chuẩn là: aflatoxin B₁ và G₁ 200 ng/ml, aflatoxin B₂ và G₂ 40 ng/ml.

Bọc kín bình trong màng nhôm và bảo quản ở nhiệt độ nhỏ hơn 4 °C. Trước khi sử dụng, không mở bình cho đến khi lượng chứa trong bình đạt đến nhiệt độ phòng để tránh hấp thụ nước do ngưng tụ.

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Yêu cầu chung

Tất cả các dụng cụ thủy tinh tiếp xúc với các dung dịch aflatoxin phải được rửa sạch bằng dung dịch axit trước khi sử dụng. Có nhiều máy rửa phòng thí nghiệm có cài đặt chương trình này. Nếu không, ngâm dụng cụ thủy tinh trong axit sulfuric (2 mol/l) trong một thời gian (ví dụ: 15 h qua đêm), sau đó rửa sạch (ví dụ: ba lần) với nước để loại bỏ hết axit. Kiểm tra bằng giấy pH để chắc chắn đã hết axit.

Việc xử lý này là cần thiết, vì khi sử dụng các dụng cụ thủy tinh không được rửa bằng axit có thể gây thất thoát aflatoxin, cụ thể với các bình cầu đáy tròn, bình định mức, ống đong, lọ hoặc ống nghiệm được sử dụng cho các dung dịch hiệu chuẩn và các dịch chiết cuối cùng (đặc biệt là lọ lấy mẫu tự động) và pipet Pasteur, được dùng để chuyển các dung dịch hiệu chuẩn hoặc dịch chiết.

5.2 Các thiết bị phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.3 Máy nghiền phòng thử nghiệm

Hoặc máy nghiền tốc độ cao chống cháy nổ, để tạo và chiết hồ nhão từ lạc, quả hồ trăn và quả vã, có bình trộn thích hợp.

5.4 Máy lắc ngang hoặc máy lắc đứng có thể điều chỉnh được, để phân tích bột ớt.

5.5 Giấy lọc gấp nếp, ví dụ đường kính 24 cm.

5.6 Bình nón, có nắp thủy tinh hoặc nắp vụn.

5.7 Giấy lọc thủy tinh mịn, giữ được cỡ hạt 1,6 μ m hoặc nhỏ hơn.

5.8 Bàu chứa, dung tích 75 ml có đầu nối với cột ái lực miễn nhiễm (IAC).

5.9 Bơm tay, dạng xyranh 20 ml có khóa hoặc nắp cao su dùng cho cột ái lực miễn nhiễm (IAC).

5.10 Bình định mức thủy tinh, ví dụ các bình dung tích 5 ml, 10 ml và 20 ml, có độ chính xác ít nhất là 0,5 %.

5.11 Hệ thống HPLC, gồm có:

5.11.1 Bơm HPLC, thích hợp với tốc độ dòng là 1,0 ml/min.

5.11.2 Hệ thống bơm, có thể bơm một vòng đầy. Nên dùng vòng bơm 200 μ l.

Trong trường hợp dùng vòng bơm có kích cỡ khác với khuyến cáo thì phải đảm bảo rằng giới hạn phát hiện của hệ thống (LOD) $\leq 0,2$ ng/g (tỷ lệ tín hiệu/nhiều = 3) và giới hạn định lượng (LOQ) $\leq 0,5$ ng/g (tỷ lệ tín hiệu/nhiều = 6) đối với từng aflatoxin (sử dụng các dung dịch chuẩn).

5.11.3 Cột HPLC pha đảo, ví dụ C₁₈ hoặc ODS-2 (dài 25 cm, đường kính trong 4,6 mm, cỡ hạt 5 μ m), đảm bảo phân giải đường nền của các pic aflatoxin B₁, B₂, G₁ và G₂ ra khỏi các pic khác. Sự chồng lấn tối đa của các pic phải nhỏ hơn 10 % (có thể cần điều chỉnh pha động để có độ phân giải đường nền tốt). Nên sử dụng tiền cột thích hợp.

5.11.4 Hệ thống tạo dẫn xuất sau cột, với PBPB (chỉ sử dụng với pha động A (4.14)).

Gồm có bơm không xung dùng cho HPLC, chi tiết chữ T thể tích chết bằng zero, ống nối phản ứng bằng PTFE kích thước tối thiểu 45 cm x 0,5 mm đường kính trong.

5.11.5 Hệ thống tạo dẫn xuất với brom tổng hợp bằng phương pháp điện hóa, ví dụ: cuvet KOBRA¹⁾ (chỉ sử dụng với pha động B (4.15)).

5.11.6 Detector huỳnh quang, với bước sóng kích thích $\lambda = 360$ nm và bước sóng phát xạ $\lambda > 420$ nm hoặc tương đương (ví dụ: detector với bộ đơn sắc có thể điều chỉnh được).

Nên cài đặt detector có thể điều chỉnh được ở bước sóng 365 nm (bước sóng kích thích), 435 nm (bước sóng phát xạ) và chiều rộng băng là 18 nm.

5.12 Dụng cụ lọc dùng một lần, cỡ lỗ 0,45 μm .

Trước khi sử dụng, kiểm tra để chắc chắn rằng aflatoxin không bị thất thoát trong quá trình lọc (phép thử độ thu hồi).

CHÚ THÍCH Các vật liệu lọc có khả năng giữ lại aflatoxin.

5.13 Pipet, dung tích 2 ml và 10 ml, với độ chính xác tối thiểu 0,5 %.

5.14 Cân phân tích, có thể cân đến 0,1 mg.

5.15 Cân kỹ thuật, có thể cân đến 0,01 g.

5.16 Xyranh microlit hoặc pipet microlit đã hiệu chuẩn, dung tích từ 25 μl đến 500 μl .

5.17 Bộ phân phối chân không, tùy chọn.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Đồng hóa một lượng thích hợp (ví dụ 10 kg, [3]) quả hồ trăn, lạc và quả vả để thu được hồ nhão, ví dụ: dùng máy nghiền tốc độ cao (5.3). Thông tin về cỡ mẫu và cách lấy mẫu có thể xem trong [3].

6.2 Ổn định cột ái lực miễn nhiễm

Để cột ái lực miễn nhiễm (4.13) đạt đến nhiệt độ phòng trước khi ổn định. Nối cột ái lực miễn nhiễm với bộ phân phối chân không (5.17) và gắn bầu chứa (5.8) vào cột ái lực miễn nhiễm.

Để ổn định, chuyển 10 ml PBS (4.2) sang đỉnh cột và để chảy qua với tốc độ 2 ml/min đến 3 ml/min qua cột (ví dụ: bằng trọng lực). Đảm bảo rằng một phần nhỏ (0,5 ml) PBS được giữ lại trên cột cho đến khi dung dịch mẫu được sử dụng.

Thực hiện các quy trình ổn định theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

¹⁾ Cuvet KOBRA là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng các sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương đương.

6.3 Chiết

6.3.1 Yêu cầu chung

Sử dụng máy nghiền tốc độ cao cho quá trình chiết hồ nhão quả vả, bơ lạc và hồ nhão quả hồ trăn, vì các sản phẩm giàu chất béo (bơ lạc và hồ nhão quả hồ trăn) cần tạo dạng nhũ tương để phá vỡ lớp chất béo và để chiết được hết. Ngoài ra, hồ nhão quả vả cần được phá vỡ trong dung môi, vì nếu sử dụng máy lắc thì sẽ không thực hiện được do hồ nhão rất sánh. Bột ớt có thể chiết được bằng cách lắc (với điều kiện là bột nghiền có cỡ hạt đến 500 μm) để xử lý một số mẫu cùng một lúc và giảm nguy cơ lây nhiễm chéo.

6.3.2 Quả vả

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3) và 300 ml dung môi chiết (4.10). Trộn trong 3 min bằng máy nghiền tốc độ cao (5.3).

Lọc dịch chiết qua giấy lọc (5.5). Dùng pipet lấy 10,0 ml dịch lọc trong cho vào cốc thủy tinh có mỏ 100 ml (hoặc tương tự) và pha loãng bằng 60 ml PBS (4.2). Cho dịch chiết mẫu đã pha loãng vào bầu chứa được nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Có thể sử dụng khối hồ nhão hoặc các phần mẫu thử lớn hơn, với điều kiện là duy trì đúng tỉ lệ (mẫu - dung môi cũng như thành phần dung môi đối với khối hồ nhão).

6.3.3 Lạc

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3) và 200 ml dung môi chiết (4.10) và 100 ml n-hexan hoặc xyclohexan (4.11). Trộn trong 3 min bằng máy nghiền tốc độ cao (5.3).

Lọc dịch chiết qua giấy lọc (5.5). Trong trường hợp tách lớp dung môi thì tiến hành lọc pha dưới. Dùng pipet lấy 10,0 ml dịch lọc trong cho vào cốc thủy tinh có mỏ 100 ml (hoặc tương tự) và pha loãng bằng 60 ml PBS (4.2). Cho dịch chiết mẫu đã pha loãng vào bầu chứa được nối với cột ái lực miễn nhiễm đã ổn định (4.13) và tiến hành như trong 6.4.

Việc tách lớp dung môi không xảy ra nếu lọc ngay sau khi nghiền trộn và n-hexan/xyclohexan sẽ được giữ lại trong bộ lọc. Có thể sử dụng bộ tách pha, nếu cần.

Có thể sử dụng phần mẫu thử lớn hơn với điều kiện duy trì được tỷ lệ dịch chiết mẫu - dung môi.

6.3.4 Quả hồ trăn

Cân khoảng 50 g phần mẫu thử đồng nhất (6.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình nón 500 ml (5.6) hoặc bình trộn. Thêm 5 g natri clorua (4.3), 200 ml dung môi chiết (4.10) và 100 ml n-hexan hoặc xyclohexan (4.11). Trộn trong 3 min bằng máy nghiền tốc độ cao (5.3).