

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11283:2016

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI –
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG ETHOXYQUIN –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG**

*Animal feeding stuffs – Determination of ethoxyquin content –
Liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2016

Lời nói đầu

TCVN 11283:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 996.13
Ethoxyquin in feeds. Liquid chromatographic method;

TCVN 11283:2016 do Viện Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và
Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng
thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thức ăn chăn nuôi - Xác định hàm lượng ethoxyquin - Phương pháp sắc ký lỏng

Animal feeding stuffs - Determination of ethoxyquin content -

Liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc ký lỏng để xác định hàm lượng ethoxyquin trong thức ăn chăn nuôi.

CHÚ THÍCH: Đối với bột thịt và thức ăn dạng ép đùn dùng cho thú nuôi, khoảng định lượng của phương pháp là từ 0,5 µg/g đến 300 µg/g.

µg/g

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 6952 (ISO 9498), *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.*

3 Nguyên tắc

Ethoxyquin được chiết bằng axetonitril. Dịch chiết được phân tích bằng sắc ký lỏng đẳng dòng với detector huỳnh quang.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác.

4.1 Nước, dùng cho phân tích sắc ký lỏng.

4.2 Axetonitril (C_2H_3N), dùng cho phân tích sắc ký lỏng.

TCVN 11283:2016

4.3 Dung dịch amoni axetat ($C_2H_7NO_2$), 0,01 M

Hòa tan 0,231 g amoni axetat trong 300 ml nước. Chuẩn bị dung dịch này trong ngày sử dụng.

4.4 Pha động dùng cho sắc ký lỏng, axetonitril (4.2) và amoni axetat 0,01 M (4.3) với tỷ lệ 70 : 30 (thể tích).

Chuẩn bị pha động này trong ngày sử dụng. Lọc và khử khí 30 min trước khi sử dụng.

4.5 Ethoxyquin ($C_{14}H_{19}NO$), dạng lỏng, có độ tinh khiết khoảng 93,5 %.

4.6 Dung dịch chuẩn

4.6.1 Dung dịch chuẩn gốc ethoxyquin, 400 μ g/ml

Cân một lượng chất chuẩn (4.5) tương ứng với 0,1000 g ethoxyquin dạng lỏng vào bình định mức sẫm màu 250 ml (5.7) và thêm axetonitril (4.2) đến vạch.

CHÚ THÍCH: Lượng ethoxyquin cần để chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc phụ thuộc vào độ tinh khiết của dịch lỏng, ví dụ: độ tinh khiết 93,5 % thì lượng ethoxyquin dạng lỏng cần lấy là $0,1000/0,935 = 0,1070$ g.

4.6.2 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 4,0 μ g/ml

Chuyển 5,0 ml dung dịch chuẩn gốc ethoxyquin (4.6.1) sang bình định mức sẫm màu 50 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

Chuyển 5,0 ml dung dịch này sang bình định mức sẫm màu 50 ml (5.7) khác và thêm axetonitril (4.2) đến vạch.

4.6.3 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 1,0 μ g/ml

Chuyển 25 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 4,0 μ g/ml (4.6.2) sang bình định mức sẫm màu 100 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

4.6.4 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 0,4 μ g/ml

Chuyển 10,0 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 4,0 μ g/ml (4.6.2) sang bình định mức sẫm màu 100 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

4.6.5 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 0,10 μ g/ml

Chuyển 5,0 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 1,0 μ g/ml (4.6.3) sang bình định mức sẫm màu 50 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

4.6.6 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 0,06 µg/ml

Chuyển 6,0 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 1,0 µg/ml (4.6.3) sang bình định mức sẫm màu 100 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

4.6.7 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 0,04 µg/ml

Chuyển 10,0 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 0,4 µg/ml (4.6.4) sang bình định mức sẫm màu 100 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

4.6.8 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 0,02 µg/ml

Chuyển 2,0 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 1,0 µg/ml (4.6.3) sang bình định mức sẫm màu 100 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

4.6.9 Dung dịch chuẩn ethoxyquin, 0,01 µg/ml

Chuyển 25 ml dung dịch chuẩn ethoxyquin 0,04 µg/ml (4.6.7) sang bình định mức sẫm màu 100 ml (5.7), thêm axetonitril (4.2) đến vạch và trộn kỹ.

Các dung dịch chuẩn ethoxyquin có thể bền được một ngày. Chú ý bảo quản tránh ánh sáng.

Tùy thuộc vào các nồng độ của chất phân tích, có thể bỏ qua một số nồng độ dung dịch hiệu chuẩn.

Sử dụng các đường hiệu chuẩn riêng cho các nền mẫu với các nồng độ ethoxyquin thấp hơn hoặc cao hơn 0,1 µg/ml.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy sắc ký lỏng (LC), áp suất hoạt động lên đến 1500 psi ± 200 psi, có bộ phận tích phân diện tích pic, có bơm LC đẳng dòng và bộ phận làm nóng cột.

Các điều kiện vận hành:

- thể tích bơm: 20 µl;
- tốc độ dòng: 1,3 ml/min;
- nhiệt độ cột: 35 °C;
- detector huỳnh quang có bước sóng kích thích 360 nm và bước sóng phát xạ 432 nm;
- thời gian lưu ethoxyquin: 6 min;

TCVN 11283:2016

Bơm pha động LC qua cột trong 30 min đến 60 min ở tốc độ 1,3 ml/min cho đến khi hệ thống cân bằng.

- 5.2 Cột LC, kích thước 250 mm với đường kính trong 4,6 mm, C18 octadecylsilan, cỡ 5 μm và cỡ lỗ 100 Å.
- 5.3 Bộ lấy mẫu, có thể phân phối 20 μl .
- 5.4 Lọ đựng mẫu sẫm màu.
- 5.5 Máy ly tâm, có thể duy trì gia tốc 3 000 g.
- 5.6 Ống ly tâm, dung tích 2 ml.
- 5.7 Bình định mức sẫm màu, dung tích 50 ml, 100 ml và 250 ml.
- 5.8 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.
- 5.9 Pipet, có thể phân phối được các lượng từ 1,0 ml đến 5,0 ml, chính xác đến $\pm 1\%$.
- 5.10 Máy trộn vortex.
- 5.11 Pipet định mức, dung tích 5 ml, 6 ml, 10 ml và 25 ml.
- 5.12 Máy nghiền phòng thử nghiệm.
- 5.13 Bộ lọc màng, cỡ lỗ 0,4 μm .

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 9498), mẫu phòng thử nghiệm sau khi nghiền có cỡ hạt nhỏ hơn hoặc bằng 0,85 mm.

Bảo quản mẫu nghiền trong vật chứa kín để giảm thiểu nhiệt và tránh tiếp xúc với ánh sáng. Phân tích mẫu thử trong vòng 30 ngày sau khi nhận.

8 Cách tiến hành

8.1 Ổn định hệ thống

Hiệu chuẩn hệ thống LC bằng các dung dịch hiệu chuẩn ethoxyquin.

Hệ thống LC phải đáp ứng được các tiêu chí sau:

- Ethoxyquin được rửa giải trong khoảng 6 min;
- Tổng thời gian chạy không vượt quá 8 min đến 9 min;
- Có thể phải điều chỉnh các điều kiện sắc ký để đảm bảo thời gian lưu đúng.

Tỷ lệ tín hiệu/nhiều của dung dịch chuẩn ethoxyquin 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.9) cần lớn hơn hoặc bằng 3. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của năm lần bơm lặp lại dung dịch chuẩn ethoxyquin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.5) phải nhỏ hơn hoặc bằng 2,0 %. Mặt khác, lặp lại các bước hiệu chuẩn và kiểm tra độ chụm bằng dung dịch chuẩn ethoxyquin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.5). Nếu RSD vẫn lớn hơn 2,0 % thì kiểm tra lại thiết bị.

Tính nồng độ ethoxyquin theo diện tích pic đo được.

8.2 Chiết mẫu

Cân hai phần mẫu thử, mỗi phần khoảng từ 0,06 g đến 0,1 g cho vào các ống ly tâm 2 ml (5.6). Dùng pipet phân phối (5.9) hoặc pipet định mức (5.11) thêm 1,5 ml axetonitril (4.2) vào mỗi ống và đậy chặt nút. Nếu phân tích phần mẫu thử lớn hơn thì tăng lượng axetonitril tương ứng để duy trì tỷ lệ 0,5 g mẫu thử trong 7,5 ml dung môi.

Trộn kỹ trên máy trộn vortex (5.10) trong 1 min và để yên 20 min. Trộn lại 1 min trên máy trộn vortex rồi ly tâm trên máy (5.5) trong 1 min ở gia tốc 3000 x g. Chuyển lớp chiết phía trên sang lọ đựng mẫu sẫm màu (5.4) và tiến hành phân tích LC.

8.3 Dụng cụ chuẩn

Trước khi phân tích các dung dịch mẫu thử, cho chạy các dung dịch chuẩn ethoxyquin (4.6) để dựng đường tuyến tính. Sử dụng bộ bơm mẫu (5.3). Chạy một dung dịch chuẩn sau khi chạy 10 mẫu thử và vào cuối mỗi mẻ để đảm bảo độ lệch của đường chuẩn là nhỏ nhất.

Sử dụng các đường hiệu chuẩn riêng đối với các nền mẫu có các nồng độ ethoxyquin nhỏ hơn và lớn hơn 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

TCVN 11283:2016

8.4 Xác định

Pha loãng các dung dịch có nồng độ lớn hơn 4,0 µg/ml bằng axetonitril (nghĩa là cho 200 µl phần nổi phía trên vào 1,8 ml axetonitril và sử dụng hệ số pha loãng $F = 10$ trong phần tính kết quả).

9 Tính và biểu thị kết quả

Tính nồng độ ethoxyquin có trong phần mẫu thử, X , bằng microgam trên gam, theo công thức sau:

$$X = \frac{C \times 1,5 \times F}{w}$$

Trong đó:

- C là nồng độ ethoxyquin trong dịch pha loãng cuối cùng, xác định từ đường chuẩn, tính bằng microgam trên mililit;
- 1,5 là thể tích axetonitril được bổ sung vào phần mẫu thử, tính bằng mililit;
- F là hệ số pha loãng. $F = 10$ nếu pha loãng các dung dịch có nồng độ lớn hơn 4,0 µg/ml. Nếu không pha loãng thì $F = 1$.
- w là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam.

Kết quả cuối cùng là giá trị trung bình của hai phép xác định lặp lại.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) Phương pháp thử đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) Tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) Kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về phương pháp xác định ethoxyquin trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc ký lỏng được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng

Mẫu	Bột gia cầm ^c	Thức ăn cho chó ^c	Bột gia cầm ^c	Thức ăn cho mèo ^c	Thức ăn cho chó ^c	Bột cá ^c	Thức ăn cho chó ^c	Thức ăn cho mèo ^c	Thức ăn cho chó ^c	Thức ăn cho mèo ^c	Bột cá ^c
Giá trị thêm chuẩn, mg/kg	– ^d	–	–	–	–	–	3,0	–	30,0	–	–
Giá trị trung bình, mg/kg	0,25	71,1	289	0,41	15,7	0,52	1,80	41,5	24,8	0,42	83,0
Độ thu hồi, %	–	–	–	–	–	–	60,0	–	82,7	–	–
Số lượng phòng thử nghiệm	8	11	11	8	11	9	11	11	11	10	10
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,08	3,2									
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,12	7,5	13	0,21	2,9	0,15	0,52	6,4	2,4	0,23	4,3
Độ lệch chuẩn lặp lại tương đối, RSD_r , %	32	4,5									
Độ lệch chuẩn tái lập tương đối, RSD_R , %	46	11	4,5	50	18	28	29	16	9,5	55	5,2
Giới hạn lặp lại, r , mg/kg ^a	0,23	8,9									
Giới hạn tái lập, R , mg/kg ^b	0,33	21	36	0,58	8,0	0,42	1,4	18	6,6	0,64	12
^a $r = 2,8 \times s_r$ ^b $R = 2,8 \times s_R$ ^c Giá trị độ lặp lại r được xác định bằng so sánh các giá trị lặp lại hai lần của một mẫu với các giá trị lặp lại hai lần của mẫu mù khác. ^d Các mẫu bị nhiễm tự nhiên. ^e Các giá trị thống kê được xác định sử dụng giá trị trung bình thu được từ các giá trị lặp lại hai lần của các lần cân riêng rẽ trên cùng mẫu thử.											