

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 4328-2 : 2011; TCVN 9109 : 2011; TCVN 9124 : 2011;

ISO 5983-2 : 2009

ISO 6867 : 2000

TCVN 9125 : 2011; TCVN 9126 : 2011; TCVN 9127 : 2011;

ISO 6866 : 1985

ISO 17375 : 2006

ISO 14797 : 1999

TCVN 9128 : 2011; TCVN 9129 : 2011; TCVN 9130 : 2011.

ISO 14939 : 2001

ISO 6655 : 1997

ISO 14902 : 2001

TCVN 9131 : 2011; TCVN 9132 : 2011.

ISO 6870 : 2002

ISO 7485 : 2000

Xuất bản lần 1

**TUYỂN TẬP TIÊU CHUẨN QUỐC GIA
VỀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
CÁC THÀNH PHẦN HÓA HỌC**

HÀ NỘI – 2011

Mục lục

Trang

• TCVN 4328-2 : 2011 ISO 5983-2 : 2009	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ và tính hàm lượng protcin thô – Phần 2 : Phương pháp phân hủy kín và chưng cất bằng hơi nước.	5
• TCVN 9109 : 2011	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng ractopamine hydroclorua bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.	25
• TCVN 9124 : 2011 ISO 6867 : 2000	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng vitamin E – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.	33
• TCVN 9125 : 2011 ISO 6866 : 1985	Thức ăn chăn nuôi – Xác định gossypol tự do và tổng số.	47
• TCVN 9126 : 2011 ISO 17375 : 2006	Thức ăn chăn nuôi – Xác định aflatoxin B ₁ .	53
• TCVN 9127 : 2011 ISO 14797 : 1999	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng furazolidon – Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao.	67
• TCVN 9128 : 2011 ISO 14939 : 2001	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng carbadox – Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao.	83
• TCVN 9129 : 2011 ISO 6655 : 1997	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng nitơ hòa tan sau khi xử lý bằng pepsin trong axit clohydric loãng.	103
• TCVN 9130 : 2011 ISO 14902 : 2001	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hoạt độ chất ức chế trypsin trong các sản phẩm đậu tương.	117
• TCVN 9131 : 2011 ISO 6870 : 2002	Thức ăn chăn nuôi – Định tính zearalenone.	129
• TCVN 9132 : 2011 ISO 7485 : 2000	Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng kali và nar – Phương pháp đo phổ phát xạ ngọn lửa.	139

Lời nói đầu

TCVN 4328-2 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 5983-2 : 2009;

TCVN 9124 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6867 : 2000;

TCVN 9125 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6866 : 1985;

TCVN 9126 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 17375 : 2006;

TCVN 9127 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14797 : 1999;

TCVN 9128 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14939 : 2001;

TCVN 9129 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6655 : 1997;

TCVN 9130 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 14902 : 2001;

TCVN 9131 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 6870 : 2002;

TCVN 9132 : 2011 hoàn toàn tương đương với ISO 7485 : 2000.

TCVN 4328-2 : 2011; TCVN 9109:2010; TCVN 9124 : 2011 ÷ TCVN 9132 : 2011 do Cục 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 carbadox – Phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao

*Animal feeding stuffs – Determination of carbadox content –
Method using high-performance liquid chromatography*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng carbadox trong thức ăn hỗn hợp và thức ăn chăn nuôi.

Phương pháp này có thể áp dụng cho thức ăn chăn nuôi có chứa 0,5 mg/kg (giới hạn định lượng) đến 100 mg/kg khối lượng và áp dụng cho thức ăn hỗn hợp có chứa carbadox lên tới 10 % khối lượng.

Giới hạn phát hiện dưới là 0,1 mg/kg.

CHÚ THÍCH 1 Đối với thức ăn chăn nuôi, phần khối lượng của carbadox tính bằng miligam trên kilogam, còn đối với thức ăn hỗn hợp là phần trăm khối lượng.

CHÚ THÍCH 2 Carbadox thuộc nhóm quinoxalin. Carbadox được dùng làm phụ gia để kích thích tăng trưởng cho lợn con.

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 6952:2001 (ISO 6498:1998) *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử*

3 Nguyên tắc

Carbadox được chiết ra khỏi mẫu bằng hỗn hợp của axetonitril và metanol. Thức ăn chăn nuôi đã được làm ẩm sơ bộ với nước. Chất chiết mẫu thức ăn chăn nuôi được làm sạch qua cột nhôm oxit ngán. Chất chiết của hỗn hợp thức ăn chăn nuôi được pha loãng trực tiếp với hỗn hợp của nước,

TCVN 9128:2011

axetonitril và metanol. Chất chiết cuối cùng được phân tích bằng HPLC pha đảo với detector UV ở bước sóng 365 nm (xem [1] đến [3]).

Sự có mặt của dimetridazole, nitrofurazone hoặc natri sulfadimidin có thể làm cản trở phép xác định carbadox.

Ngoài ra, carbadox có thể xác định được sau khi tạo dẫn xuất sau cột với natri hydroxit sau đó phát hiện ở bước sóng 420 nm.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích.

4.1 Nước, đã khử khoáng hoặc đã khử ion, với điện trở suất ít nhất là 10 M Ω .cm, hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

4.2 Dung môi chiết: hỗn hợp của axetonitril và metanol (1:1 tính theo thể tích).

Trộn các thể tích bằng nhau của axetonitril và metanol. Trộn kỹ và chỉnh về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

4.3 Dung môi pha loãng: hỗn hợp của dung môi chiết (4.2) và nước (4.1) (70:30 tính theo thể tích)

Trộn 70 ml dung môi chiết (4.2) với 30 ml nước (4.1).

4.4 Axit axetic, $w(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 10\%$ phần thể tích.

Pha loãng 10 ml axit axetic bằng với nước đến 100 ml.

4.5 Dung dịch natri axetat, $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2) = 0,01 \text{ mol/l}$, pH = 6,0.

Cân 0,82 g natri axetat không chứa nước cho vào bình định mức một vạch 1 000 ml. Hòa tan trong 700 ml nước. Điều chỉnh pH tới pH = 6 bằng axit axetic (4.4). Pha loãng bằng nước tới vạch và trộn.

4.6 Pha động dùng cho HPLC.

Gộp 825 ml dung dịch natri axetat (4.5) và 175 ml axetonitril và trộn. Lọc dịch rửa giải qua bộ lọc 0,22 μm sử dụng hệ thống lọc dung môi (5.2), khử khí 10 min trong bể siêu âm (5.3) trước khi sử dụng.

4.7 Chất chuẩn carbadox, methyl este *N,N'*-dioxit của axit 3-(2-quinoxalinylnyl metylen) carbazic (CAS 6804-07-5).

CẢNH BÁO – Vì carbadox nhạy với ánh sáng, do đó cần tránh ánh sáng ban ngày hoặc ánh sáng trắng nhân tạo. Tránh hít phải và tiếp xúc với chất chuẩn carbadox độc và các dung dịch

của chúng. Làm việc trong tủ hút khói khi tiếp xúc với các dung môi và dung dịch. Mang kính an toàn và mặc quần áo bảo hộ.

4.8 Dung dịch gốc carbadox (khoảng 100 µg/ml)

Cân 10 mg $\pm$ 1 mg carbadox (4.7), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Hòa tan trong dung môi chiết (4.2), pha loãng tới vạch và trộn. Tính nồng độ của dung dịch có tính đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Chuẩn bị dung dịch mới hàng tháng. Bảo quản trong tối ở 0 °C tới 8 °C.

4.9 Dung dịch làm việc carbadox (khoảng 2 µg/ml đến 10 µg/ml).

Dùng pipet lấy 1,0 ml và 5,0 ml dung dịch gốc carbadox (4.8) cho vào các bình định mức một vạch 50 ml riêng rẽ. Pha loãng bằng dung môi pha loãng (4.3) tới vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới cho mỗi dãy mẫu.

4.10 Dung dịch làm việc carbadox (khoảng 0,4 µg/ml đến 2 µg/ml).

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch gốc carbadox (4.8) cho vào bình định mức một vạch 50 ml, pha loãng bằng pha động (4.6) tới vạch và trộn. Dùng pipet lấy 10 ml dung dịch này (2 µg/ml) cho vào bình định mức một vạch 50 ml, pha loãng bằng pha động (4.6) tới vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới cho mỗi dãy mẫu.

4.11 Chất chuẩn dimetridazole, 1,2-dimetyl-5-nitro-1H-imidazole (CAS 551-92-8).

CẢNH BÁO – Vì dimetridazole nhạy với ánh sáng, do đó cần tránh ánh sáng ban ngày hoặc ánh sáng trắng nhân tạo. Tránh hít phải và tiếp xúc với chất chuẩn dimetridazole độc và các dung dịch của chúng. Làm việc trong tủ hút khói khi tiếp xúc với các dung môi và dung dịch. Mang kính an toàn và mặc quần áo bảo hộ.

4.12 Dung dịch gốc dimetridazole (khoảng 100 µg/ml)

Cân 10 mg $\pm$ 1 mg dimetridazole (4.11), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng bằng metanol tới vạch và trộn. Tính nồng độ của dung dịch có tính đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Chuẩn bị dung dịch mới hàng tháng. Bảo quản ở nơi tối ở 0 °C đến 8 °C.

4.13 Dung dịch làm việc dimetridazole (khoảng 20 µg/ml).

Dùng pipet lấy 2,0 ml dung dịch gốc dimetridazole (4.12) cho vào bình định mức một vạch 10 ml. Pha loãng bằng nước tới vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới cho mỗi dãy mẫu.

4.14 Chất chuẩn sulfadimidin, muối natri của 4-amino-N-(4,6-dimetyl-2-pyrimidinyl) benzen sulfonamid (CAS 1981-58-4).

CẢNH BÁO – Tránh hít phải và tiếp xúc với chất chuẩn sulfadimidin độc và các dung dịch của chúng. Làm việc trong tủ hút khói khi tiếp xúc với các dung môi và dung dịch. Mang kính an toàn và mặc quần áo bảo hộ.

4.15 Dung dịch gốc sulfadimidin (khoảng 200 µg/ml).

Cân 10 mg $\pm$ 1 mg chất chuẩn sulfadimidin (4.14), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức một vạch 50 ml. Pha loãng bằng metanol tới vạch và trộn. Tính nồng độ của dung dịch có tính đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Chuẩn bị dung dịch mới hàng tháng. Bảo quản ở nơi tối ở 0 °C đến 8 °C.

4.16 Dung dịch làm việc sulfadimidin (khoảng 20 µg/ml).

Dùng pipet lấy 1,0 ml dung dịch gốc sulfadimidin (4.15) cho vào bình định mức một vạch 10 ml. Pha loãng bằng nước tới vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới cho mỗi dãy mẫu.

4.17 Chất chuẩn nitrofurazone, 5-nitro-2-furaldehyt semicarbazone (CAS 59-87-0).

CẢNH BÁO – Vì nitrofurazone nhạy với ánh sáng, do đó cần tránh ánh sáng ban ngày hoặc ánh sáng trắng nhân tạo. Tránh hít phải và tiếp xúc với chất chuẩn nitrofurazone độc và các dung dịch của chúng. Làm việc trong tủ hút khói khi tiếp xúc với các dung môi và dung dịch. Mang kính an toàn và mặc quần áo bảo hộ.

4.18 Dung dịch gốc nitrofurazone (khoảng 100 µg/ml).

Cân 10 mg $\pm$ 1 mg nitrofurazone (4.17), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức một vạch 100 ml. Pha loãng bằng metanol tới vạch và trộn. Tính nồng độ của dung dịch có tính đến độ tinh khiết của chất chuẩn. Chuẩn bị dung dịch mới hàng tháng. Bảo quản ở nơi tối ở 0 °C tới 8 °C.

4.19 Dung dịch làm việc nitrofurazone (khoảng 20 µg/ml).

Dùng pipet lấy 2,0 ml dung dịch gốc nitrofurazone (4.18) cho vào bình định mức một vạch 10 ml. Pha loãng bằng nước tới vạch và trộn. Chuẩn bị dung dịch mới cho mỗi dãy mẫu.

4.20 Nhôm oxit trung tính, hoạt tính bằng 1.

Đề khur hết hoạt tính sử dụng từ 0 % đến 1 % nước.

4.21 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

Cân 20 g natri hydroxit cho vào bình định mức một vạch 1 lít và hòa tan trong 10 ml nước. Pha loãng bằng nước tới vạch và trộn.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy đo pH.

5.2 Hệ thống lọc dung môi, tất cả các dụng cụ bằng thủy tinh thích hợp với bộ lọc có cỡ lỗ 0,22 μm .

5.3 Bể siêu âm

5.4 Máy lắc quay, chuyển động ngang, tần số lắc 250 lần/phút đến 300 lần/phút.

5.5 Bộ lọc sợi thủy tinh, đường kính 15 cm.

5.6 Bông thủy tinh.

5.7 Cột thủy tinh dùng cho máy sắc ký, dài 30 cm, đường kính trong 10 mm, một đầu được nút bằng nút bông thủy tinh (5.6) hoặc một cột tương đương có đường kính trong 10 mm.

5.8 Hệ thống lọc, được trang bị bộ lọc polyvinylidene difluoride (PVDF) hoặc bộ lọc polytetrafluoretylen (PTFE) cỡ lỗ 0,45 μm .

5.9 Nồi cách thủy, có thể làm nóng đến 50 °C, hoặc bộ phận gia nhiệt, được trang bị nguồn cấp nitơ.

5.10 Hệ thống HPLC, bao gồm những phần sau:

5.10.1 Bơm, không rung, có thể duy trì tốc độ dòng 0,5 ml/min đến 1,5 ml/min.

5.10.2 Hệ thống bơm, có các vòng bơm thích hợp dung tích từ 20 μl đến 100 μl .

5.10.3 Detector UV, thích hợp để đo ở bước sóng 365 nm.

Có thể sử dụng detector mảng diot dùng cho mục đích khẳng định, nếu có sẵn.

5.10.4 Máy ghi.

5.10.5 Cột bảo vệ: Cột C_{18} nhồi silica có cỡ hạt khoảng 30 μm , chiều dài 20 mm, đường kính trong 3,9 mm, hoặc cột bảo vệ có chất lượng tương đương.

5.10.6 Cột phân tích.

Đối với thức ăn chăn nuôi có chứa carbadox ít hơn 10 mg/kg khối lượng, thì sử dụng cột C_{18} nhồi silica với cỡ hạt 5 μm , dài 200 mm, đường kính trong 3,0 mm, hoặc cột phân tích có chất lượng tương đương.

TCVN 9128:2011

Đối với thức ăn chăn nuôi và hỗn hợp thức ăn có chứa carbadox bằng hoặc lớn hơn 10 mg/kg khối lượng, thì sử dụng cột C₁₈ nhồi silica với cỡ hạt 5 µm, dài 300 mm, đường kính trong 3,0 mm, hoặc cột phân tích có chất lượng tương đương.

Đối với carbadox, phải thu được hệ số khả năng (K') ít nhất là 1,0.

Hệ số khả năng được xác định:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Trong đó:

K' là hệ số khả năng;

t_R là thời gian lưu của carbadox, tính bằng phút (min);

t_0 là thời gian lưu của pic không ổn định, tính bằng phút (min).

5.10.7 Bơm nhu động (dùng cho dẫn xuất sau cột)

5.10.8 Cuộn phản ứng (dùng cho dẫn xuất sau cột), polytetrafluorethylene (PTFE), dài 2 m, đường kính trong 0,5 mm.

5.10.9 Detector UV/Vis, thích hợp để đo ở bước sóng 420 nm (dùng cho dẫn xuất sau cột)

5.11 Bơm tiêm dùng một lần, dung tích 5 ml.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497) [5].

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.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 6498).

Nghiền mẫu phòng thử nghiệm (thường là 500 g) sao cho lọt hết qua sàng cỡ lỗ 1 mm. Trộn thật kỹ.

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

Đồng thời với việc phân tích mẫu thử (hoặc dấy mẫu thử), tiến hành phân tích mẫu trắng và mẫu trắng thêm chuẩn. Nếu cần, có thể phân tích mẫu đối chứng để kiểm tra hiệu suất của phương pháp.

Phụ lục A đưa ra biểu đồ trình tự của quy trình.

Đối với các mẫu thử trắng, sử dụng phần mẫu của thức ăn đã đồng nhất có chứa ít hơn 0,1 mg/kg carbadox. Đối với mẫu trắng thêm chuẩn, sử dụng mẫu trắng có bổ sung carbadox. Mẫu trắng và mẫu đối chứng có thể giữ được một năm nếu được bảo quản ở nhiệt độ 0 °C đến 8 °C.

Đối với carbadox 50 mg/kg khối lượng độ thu hồi thấp hơn 91 % hoặc cao hơn 103 % thì phép phân tích cần được lặp lại.

8.2 Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn

Lượng carbadox trong mẫu thêm chuẩn nên gần bằng với lượng carbadox dự kiến có trong mẫu thử. Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn chứa 50 mg/kg carbadox như sau:

Dùng pipet lấy 5,0 ml dung dịch gốc (4.8) cho vào bình nón 250 ml. Làm bay hơi đến khi còn khoảng 0,5 ml dưới dòng nitơ rồi thêm 10 g mẫu trắng. Trộn kỹ và để yên ít nhất 10 min trước khi tiến hành chiết (8.3).

8.3 Chiết

8.3.1 Thức ăn chăn nuôi chứa 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg carbadox

Cân 10,0 g mẫu thử đã chuẩn bị, chính xác đến 0,1 g, cho vào trong bình nón 250 ml. Thêm 50,0 ml dung môi chiết (4.4), đậy kín và lắc mạnh 30 min trên máy lắc quay (5.4). Lọc dung dịch qua bộ lọc sợi thủy tinh (5.5) và sử dụng phần dịch lọc để phân tích sắc ký cột theo 8.4.

8.3.2 Thức ăn chăn nuôi chứa từ 10 mg/kg đến 100 mg/kg carbadox

Cân 5,0 g mẫu thử đã chuẩn bị chính xác đến 0,1 g cho vào bình nón 250 ml. Thêm 15,0 ml nước, trộn rồi để yên 5 min. Thêm 35,0 ml dung môi chiết (4.2), sau đó đậy kín và lắc mạnh trong 30 min trên máy lắc quay (5.4). Lọc dung dịch qua bộ lọc sợi thủy tinh (5.5) và sử dụng dịch lọc để phân tích sắc ký cột theo 8.4.

8.3.3 Hỗn hợp thức ăn chăn nuôi chứa đến 2,0 % carbadox

Cân 1,0 g mẫu thử đã chuẩn bị, chính xác đến 0,01 g, cho vào bình nón 250 ml. Thêm 15,0 ml nước, trộn và để yên 5 min. Thêm 35,0 ml dung môi chiết (4.2) sau đó đậy nắp và lắc mạnh 30 min trên máy lắc quay (5.4). Lọc dung dịch qua bộ lọc sợi thủy tinh (5.5).

Pha loãng dịch lọc bằng dung môi pha loãng (4.3) thu được dung dịch cuối có carbadox trong khoảng 5 µg/ml đến 10 µg/ml phần khối lượng. Hệ số pha loãng là f .

Trộn kỹ và lọc dung dịch sử dụng hệ thống lọc (5.8). Sử dụng dịch lọc để phân tích HPLC theo 8.5.

Hệ số pha loãng yêu cầu (f) có thể được ước tính bằng cách sử dụng công thức:

$$f_e = \frac{m.w_e}{V.\rho_r}$$

Trong đó

f_e là hệ số pha loãng yêu cầu ước tính của dịch chiết mẫu;

m là khối lượng của phần thử, tính bằng gam (g);

w_e là phần khối lượng carbadox dự kiến có trong mẫu, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg);

ρ_r là nồng độ carbadox yêu cầu có trong dung dịch cuối, tính bằng microgam trên mililit (µg/ml);

V là thể tích tổng của dung môi chiết thêm vào phần thử, tính bằng mililit (ml) (xem thêm 8.5.2.3).

8.3.4 Hỗn hợp thức ăn chăn nuôi chứa từ 2,0 % đến 10 % carbadox

Cân 0,5 g mẫu thử đã chuẩn bị, chính xác đến 5 mg, cho vào bình nón 250 ml. Thêm 45,0 ml nước, trộn và để yên 5 min. Thêm 105,0 ml dung môi chiết (4.2) đậy nắp và trộn. Đặt bình trong bể siêu âm (5.3) 15 min. Lắc mạnh 15 min trên máy lắc quay (5.4). Lọc dung dịch qua bộ lọc sợi thủy tinh (5.5).

Pha loãng dịch lọc bằng dung môi pha loãng (4.3) để thu được dung dịch cuối với phần khối lượng carbadox trong khoảng từ 5 µg/ml đến 10 µg/ml. Hệ số pha loãng là f .

Trộn kỹ và lọc dung dịch sử dụng hệ thống lọc (5.8). Sử dụng dịch lọc để phân tích HPLC theo 8.5.

CHÚ THÍCH Xem 8.3.3 về cách tính hệ số pha loãng ước tính.

8.4 Sắc ký cột

8.4.1 Để chiết mẫu, dùng cột thủy tinh (5.7) được nhồi khô bằng 4 g nhôm oxit (4.20), đáy cột được nút bằng bông thủy tinh (5.6). Dùng 15 ml chất chiết, đã chuẩn bị theo 8.3.1 hoặc 8.3.2, cho vào cột và loại bỏ 2 ml dịch rửa giải đầu tiên.

Đối với mẫu chứa từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg carbadox, thì tiến hành theo 8.4.2.

Đối với mẫu chứa từ 10 mg/kg đến 100 mg/kg carbadox, thì tiến hành theo 8.4.3.

8.4.2 Thu lấy 6 ml dịch rửa giải vào ống đong nhỏ có chia vạch. Dùng pipet lấy 4 ml dịch rửa giải cho vào ống nghiệm hiệu chuẩn và làm bay hơi dung môi đến gần khô, sử dụng nồi cách thủy hoặc bộ phận gia nhiệt (5.9) ở 40 °C đến 50 °C dưới dòng nitơ nhẹ. Pha loãng bằng 2 ml pha động (4.6). Trộn trong bể siêu âm (5.3) và lọc dung dịch qua hệ thống lọc (5.8). Sử dụng dịch lọc để phân tích HPLC theo 8.5.

8.4.3 Thu lấy 4 ml dịch rửa giải vào ống đong nhỏ có chia vạch và lọc dung dịch qua hệ thống lọc (5.8). Sử dụng dịch lọc để phân tích HPLC theo 8.5.

8.5 Phân tích HPLC

8.5.1 Các điều kiện HPLC

Xem Bảng 1

Bảng 1

Thông số	Cài đặt phần khối lượng của carbadox đến 10 mg/kg	Cài đặt phần khối lượng của carbadox ≥ 10 mg/kg
Cột phân tích	ChromSpher C ₁₈ ^a	μBondapak C ₁₈ ^a
Tốc độ dòng thể tích pha động	0,6 ml/min	1,5 ml/min
Thể tích bơm	50 μl	20 μl
Bước sóng	365 nm	365 nm
Độ nhạy (chỉ thị)	0,005 AUFS đến 0,04 AUFS	0,02 AUFS đến 0,08 AUFS
Máy ghi	10 mV	10 mV
Tốc độ vẽ đồ thị	1,0 cm/min	1,0 cm/min

^a ChromSpher và μBondapak là những ví dụ về các sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

Các điều kiện nêu trong Bảng 1 chỉ mang tính chỉ dẫn, vì trong thực tế việc cài đặt sẽ liên quan đến cột và detector được sử dụng

8.5.2 Cách tiến hành

8.5.2.1 Bơm dung dịch làm việc carbadox (4.9) vào máy sắc ký cho đến khi đường nền ổn định và đến khi thu được chiều cao pic hoặc diện tích pic tái lập. Đối với chiều cao pic hoặc diện tích pic, chênh lệch giữa kết quả cao nhất và thấp nhất cần nhỏ hơn 5 % kết quả trung bình của ba lần bơm liên tiếp.

Trong phép phân tích hỗn hợp thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi chứa bằng hoặc nhiều hơn 10 mg/kg carbadox, sử dụng các dung dịch làm việc carbadox (4.9).

Trong phép phân tích thức ăn chăn nuôi chứa ít hơn 10 mg/kg carbadox, sử dụng các dung dịch làm việc carbadox nồng độ thấp hơn (4.10).

Pic của carbadox phải đối xứng ($f_{as} < 2$).

CHÚ THÍCH f_{as} là chiều rộng ở phía cuối đường vuông góc của pic, chia cho chiều rộng phía trước đường vuông góc của pic, cả hai được đo ở vị trí 10 % chiều cao pic.

8.5.2.2 Giữa các nồng độ và chiều cao pic của hai dung dịch làm việc carbadox phải có mối tương quan tỷ lệ thuận (trong phạm vi 5 %). Nếu chênh lệch lớn hơn 5 % thì cần phải chuẩn bị các dung dịch làm việc carbadox mới.

Bơm các chất chiết mẫu trắng, mẫu trắng thêm chuẩn và dung dịch làm việc dimetridazol (4.13), sulfadimidin (4.16) và nitrofurazon (4.9). Nếu pic carbadox không đối xứng hoặc không tách hoàn toàn khỏi các pic của chất nền hoặc pic của các dung dịch chuẩn được bơm thì cần sử dụng cột HPLC khác hoặc điều chỉnh các điều kiện sắc ký bằng cách tăng hoặc giảm hàm lượng nước của pha động (4.6).

Bơm lần lượt các dung dịch làm việc carbadox (4.9 hoặc 4.10), năm dịch chiết mẫu và bơm lại các dung dịch làm việc carbadox. Lặp lại trình tự này đối với các dãy chất chiết mẫu khác, nếu cần.

Chiều cao pic hoặc diện tích pic quan sát được đối với các dung dịch làm việc carbadox cần nằm trong khoảng 5 % các kết quả của các dung dịch làm việc carbadox được bơm vào trước đó.

8.5.2.3 Nếu phần khối lượng carbadox trong hỗn hợp thức ăn chăn nuôi thấp hơn nhiều so với phần khối lượng dự kiến (có tính đến dung sai), thì nên lặp lại các bước phân tích theo 8.3.3 hoặc 8.3.4 có bổ sung 50 ml dung môi chiết gồm 35 ml dung môi chiết (4.2) và 15,0 ml nước.

Nếu phần khối lượng carbadox mới thu được lớn hơn 15 % so với giá trị ban đầu, thì cần lặp lại phép phân tích với 50 ml dung môi chiết khác đã mô tả ở trên. Việc xác định bổ sung này cần được lặp lại cho đến khi chênh lệch kết quả của các lần xác định liên tiếp carbadox nhỏ hơn 15 %.

9 Khẳng định

9.1 Yêu cầu chung

Nếu việc nhận biết của chất cần phân tích có pic trong sắc ký phổ còn chưa rõ ràng dựa vào hình dạng pic hoặc dựa vào kết quả thu được, thì việc nhận biết này cần được khẳng định lại bằng cách áp dụng đồng sắc ký hoặc detector mảng diot. Nếu khẳng định bằng đồng sắc ký thì tiến hành theo 9.2 còn sử dụng detector mảng diot thì tiến hành theo 9.3.. Ngoài ra, sự có mặt của carbadox có thể được khẳng định bằng cách sử dụng việc tạo dẫn xuất sau cột với dung dịch natri hydroxit (xem 9.4).

9.2 Đồng sắc ký

Chuẩn bị dịch chiết mẫu có bổ sung chuẩn bằng cách thêm một lượng thích hợp của dung dịch làm việc carbadox (4.10) vào dịch chiết mẫu. Lượng carbadox được thêm vào phải gần bằng lượng carbadox dự kiến có trong dịch chiết mẫu.

Bơm dịch chiết mẫu, dung dịch làm việc carbadox (4.10) và dịch chiết mẫu thêm chuẩn. Chỉ có pic trong sắc ký được coi là pic của chất phân tích có tăng lên tỷ lệ thuận với mức thêm vào và việc tăng chiều rộng của pic tại một nửa chiều cao không lớn hơn $\pm 10\%$ chiều rộng ban đầu.

Tiến hành tiếp theo Điều 10.

9.3 Detector mảng diot

9.3.1 Điều kiện

Các điều kiện được mô tả trong 8.5.1, tuy nhiên detector mảng diot được sử dụng thay cho detector UV, xem Bảng 2.

Bảng 2

Thông số	Cài đặt
Bước sóng mẫu	365 nm
Độ rộng băng tần mẫu	4 nm (nghĩa là bước sóng 365 nm $\pm$ 2 nm)
Bước sóng đối chứng	450 nm
Độ rộng băng tần đối chứng	100 nm
Dải quang phổ	225 nm đến 400 nm
Phổ	đường nền, đỉnh, điểm uốn lên và điểm uốn xuống

9.3.2 Cách tiến hành

Để cho hệ thống ổn định. Bơm 2 µg/ml dung dịch làm việc carbadox (4.10), dịch chiết mẫu còn nghi ngờ và bơm tiếp 2 µg/ml dung dịch làm việc carbadox (4.10). Ghi lại phổ ở đường nền, điểm uốn lên và điểm uốn xuống và đỉnh pic. Lưu giữ tất cả các dữ liệu.

9.3.3 Đánh giá

Vẽ trong một hình các phổ khác nhau đã chuẩn hóa (mẫu – đường nền) của pic mẫu, đã ghi lại ở đỉnh và ở điểm uốn lên và điểm uốn xuống.

Vẽ trong một hình các phổ đã chuẩn hóa của pic mẫu và của pic dung dịch làm việc carbadox được ghi lại ở đỉnh.

9.3.4 Tiêu chí khẳng định

Việc nhận biết chất phân tích được khẳng định nếu thỏa mãn các tiêu chí sau đây:

- a) Thời gian lưu của pic mẫu phải bằng ($\pm 5\%$) thời gian lưu của pic chuẩn. Trong trường hợp còn nghi ngờ thì phải thêm chuẩn (chất chuẩn được thêm vào mẫu).
- b) Đánh giá độ tinh khiết của pic mẫu theo sự phù hợp của chênh lệch phổ, được ghi lại ở đỉnh và ở điểm uốn lên và điểm uốn xuống. Ở mỗi bước sóng độ hấp thụ tương đối phải ngang bằng (trong khoảng 15 %) đối với tất cả các phổ.
- c) Đối với các phần của phổ với độ hấp thụ tương đối nhỏ nhất 10 % chênh lệch phổ của pic mẫu và pic chuẩn được ghi lại ở đỉnh pic không được có sự khác biệt đáng kể. Tiêu chí này được đáp ứng khi các giá trị cực đại cùng có mặt trong một biên độ xác định bởi độ phân giải của hệ thống detector (điển hình từ 2 nm đến 4 nm). Không được có điểm quan sát nào có độ lệch giữa hai phổ vượt quá 15 % độ hấp thụ của chất chuẩn ở bước sóng cụ thể.

9.4 Dẫn xuất sau cột

9.4.1 Yêu cầu chung

Bằng chứng bổ sung về sự có mặt của carbadox, đặc biệt là trong các mẫu chứa ít hơn 5 mg/kg, có thể tìm được bằng cách áp dụng dẫn xuất sau cột đặc thù cho carbadox. Trong trường hợp này tiến hành như sau.

Dùng khớp nối chữ T và một bơm nhu động (5.10.7), sau cột phân tích và trước cuộn phản ứng (5.10.8), thêm dung dịch natri hydroxit (4.23) vào pha động. Độ hấp thụ cực đại của carbadox sẽ dịch chuyển đến bước sóng 420 nm.

9.4.2 Điều kiện

Xem Bảng 3.

Bảng 3

Thông số	Cài đặt
Tốc độ dòng thể tích thuốc thử	0,23 ml/min
Bước sóng	420 nm
Thể tích bơm	100 µl

10 Tính kết quả

10.1 Yêu cầu chung

Tính phần khối lượng carbadox trong mẫu bằng cách so sánh chiều cao pic hoặc diện tích pic của chất chiết mẫu với trung bình của chiều cao pic hoặc diện tích pic của các dung dịch làm việc carbadox được bơm vào trước và sau mẫu. Sử dụng các kết quả thu được với dung dịch làm việc carbadox có phần khối lượng phù hợp nhất của carbadox.

10.2 Thức ăn chăn nuôi chứa từ 0,1 mg/kg đến 10 mg/kg carbadox

Tính phần khối lượng carbadox (w_c) trong mẫu thức ăn chăn nuôi bằng công thức:

$$w_c = \frac{h}{h_s} \cdot \rho_s \cdot \frac{V}{2m}$$

Trong đó:

w_c là phần khối lượng carbadox trong mẫu thử, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg);

h là chiều cao pic thu được đối với chất chiết mẫu, tính bằng đơn vị độ dài;

h_s là chiều cao pic thu được đối với dung dịch làm việc carbadox, tính bằng đơn vị chiều dài;

ρ_s là nồng độ carbadox trong dung dịch làm việc carbadox, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$);

V là thể tích tổng số của dung môi chiết được thêm vào phần mẫu thử, tính bằng mililit (ml);

m là khối lượng của phần thử, tính bằng gam (g).

Ngoài ra, có thể sử dụng diện tích pic trong tính toán thay cho chiều cao pic và sử dụng phương pháp hồi quy tuyến tính để tính hàm lượng carbadox trong chất chiết mẫu.

Làm tròn kết quả đến 0,1 mg/kg.

10.3 Thức ăn chăn nuôi chứa từ 10 mg/kg đến 100 mg/kg carbadox

Tính phần khối lượng carbadox (w_c) trong mẫu thức ăn chăn nuôi bằng công thức:

$$w_c = \frac{h}{h_s} \cdot \rho_s \cdot \frac{V}{m}$$

Ý nghĩa của các ký hiệu giống như trong 10.2.

Ngoài ra, có thể sử dụng diện tích pic trong tính toán thay cho chiều cao pic và sử dụng hồi quy tuyến tính để tính hàm lượng carbadox trong chất chiết mẫu.

Làm tròn kết quả đến 1 mg/kg.

10.4 Premix chứa đến 10 % carbadox

Tính phần khối lượng carbadox (w_{cp}) trong mẫu premix bằng công thức:

$$w_{cp} = \frac{h}{h_s} \cdot \rho_s \cdot \frac{V}{m} \cdot f \times 10^{-4} f_u$$

Trong đó

w_{cp} là phần khối lượng carbadox trong mẫu premix, tính bằng phần trăm (%);

w_s là nồng độ carbadox trong dung dịch làm việc carbadox, tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$);

f là hệ số pha loãng của chất chiết mẫu (xem 8.3.3 hoặc 8.3.4);

f_u là hệ số hiệu chỉnh đơn vị ($f_u = 1 \text{ kg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \%$).

Ý nghĩa của các ký hiệu giống như trong 10.2.

Ngoài ra, có thể sử dụng diện tích pic trong tính toán thay cho chiều cao pic và sử dụng hồi quy tuyến tính để tính nồng độ carbadox trong chất chiết mẫu.

Làm tròn kết quả đến 0,01 %.

11 Độ chụm

11.1 Thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp, bao gồm chú thích về tính hợp lệ của các số liệu độ chụm, được đưa ra trong Phụ lục B. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không thể áp dụng cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, thực hiện trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- a) 10 % trung bình của hai kết quả thử đối với phần khối lượng carbadox đến 50 mg/kg;
- b) 14 % giá trị trung bình của hai kết quả thử đối với phần khối lượng carbadox trong khoảng từ 1 % đến 10 %.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, thu được khi sử dụng cùng phương pháp, tiến hành thử trên vật liệu giống nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các nhà phân tích khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau thực hiện, không quá 5 % các trường hợp lớn hơn:

- a) 25 % trung bình của hai kết quả thử đối với phần khối lượng carbadox đến 50 mg/kg;
- b) 18 % trung bình của hai kết quả thử đối với phần khối lượng carbadox trong khoảng từ 1 % đến 10 %.

12 Báo cáo thử nghiệm

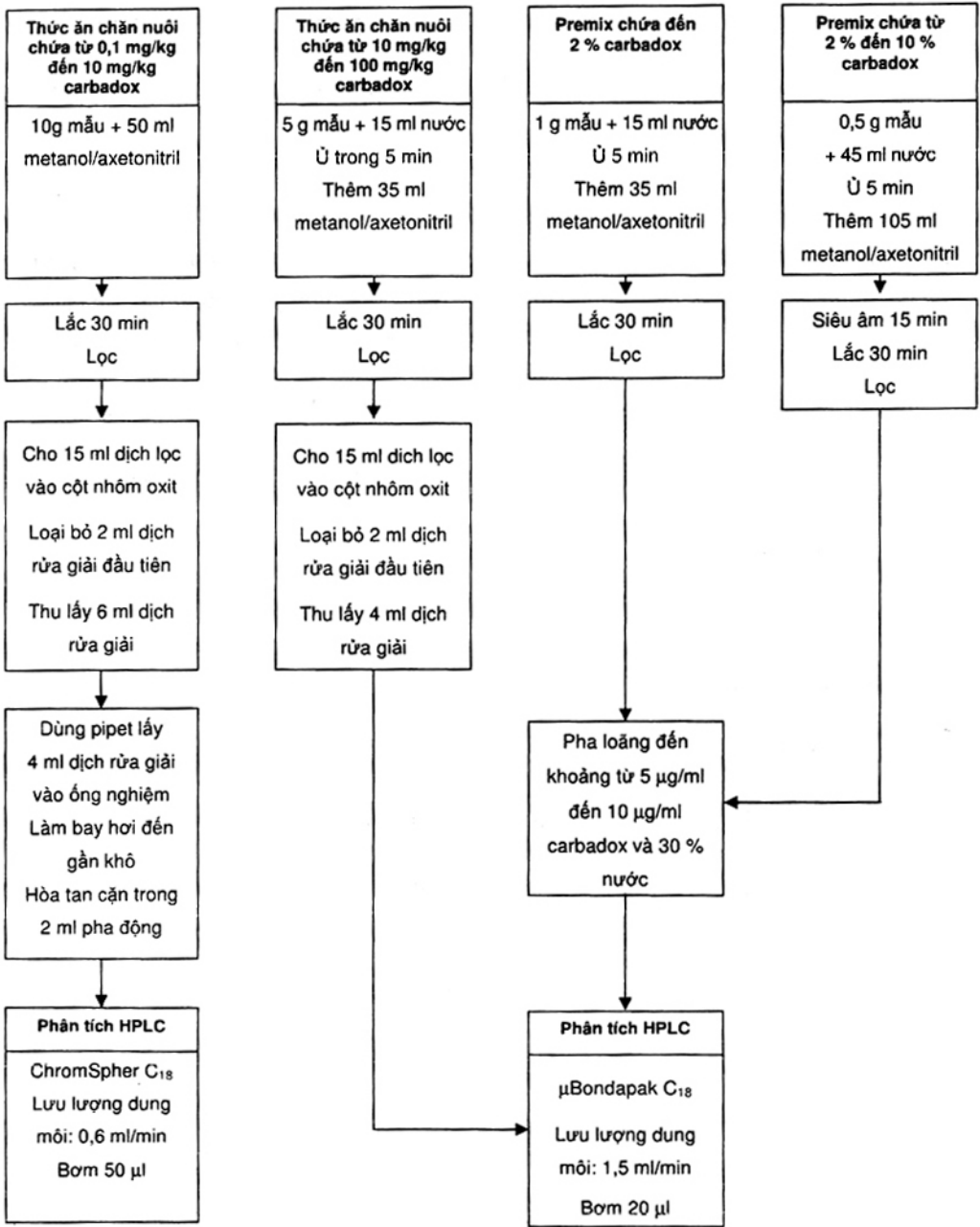
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- 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, cũng như 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 tới kết quả;
- e) kết quả thử thu được, hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu hai kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Sơ đồ quy trình



Phụ lục B

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Độ chụm của phương pháp được thiết lập bởi phép thử liên phòng thử nghiệm được tiến hành ở Hà Lan phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) [4]. Trong phép thử này có 8 phòng thử nghiệm tham gia và 13 mẫu được kiểm tra đánh giá.

Các dữ liệu về độ chụm thu được cho thấy số phòng thử nghiệm (7) được giữ lại sau khi trừ ngoại lệ hoàn toàn không đáp ứng được yêu cầu của IUPAC-AOAC (cần ít nhất là kết quả của 8 phòng thử nghiệm sau khi đã trừ các ngoại lệ). Tuy nhiên, các số liệu về kết quả của độ chụm có thể được chấp nhận để sử dụng trong thực tế, mặc dù mức xác suất của giới hạn độ lặp lại và độ tái lập sẽ nhỏ hơn 95 %.

Bảng B.1 – Các kết quả thống kê của phép thử liên phòng thử nghiệm với thức ăn chăn nuôi

Thông số	Mẫu					
	Thức ăn khởi động 1			Thức ăn khởi động 2		
	Dạng bột	Dạng viên ^a	Dạng viên ^b	Dạng bột	Dạng viên ^a	Dạng viên ^b
Số phòng thử nghiệm được giữ lại sau khi đã trừ ngoại lệ	7	7	7	7	7	7
Phần khối lượng trung bình của carbadox, mg/kg	50,0	49,7	46,9	47,6	49,7	48,2
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_R), mg/kg	2,9	1,6	1,5	2,7	2,1	1,6
Hệ số biến thiên lặp lại, %	5,8	3,1	3,2	5,6	4,3	2,9
Giới hạn độ lặp lại (r) [$r = 2,8s_R$], mg/kg	8,2	4,4	4,3	7,6	6,0	4,4
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R), mg/kg	3,9	2,6	2,3	4,1	2,4	2,2
Hệ số biến thiên tái lập, %	7,8	5,2	4,8	8,7	4,9	4,6
Giới hạn độ tái lập (R) [$R = 2,8 s_R$], mg/kg	11,1	7,3	6,4	11,7	6,9	6,3
^a thức ăn giai đoạn khởi động cho lợn con, dạng viên không cần gia nhiệt.						
^b thức ăn giai đoạn khởi động cho lợn con, dạng ép viên sau khi gia nhiệt bằng cách bơm hơi nước (ở 40 °C).						

Bảng B.2 – Các kết quả thống kê của phép thử liên phòng thử nghiệm với premix

Thông số	Mẫu ^a						
	1	2	3	4	5	6	7
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	7	7	7	7	7	7	7
Phần khối lượng trung bình của carbadox, %	0,889	0,929	0,921	0,876	9,53	9,81	10,10
Độ lệch chuẩn lặp lại (s_r), %	0,037	0,028	0,028	0,044	0,463	0,502	0,449
Hệ số biến thiên lặp lại, %	4,21	3,02	3,01	5,05	4,84	5,10	4,45
Giới hạn lặp lại (r) [$r = 2,8s_r$], %	0,106	0,079	0,079	0,125	1,31	1,42	1,27
Độ lệch chuẩn tái lập (s_R), %	0,037	0,028	0,040	0,055	0,463	0,512	0,456
Hệ số biến thiên tái lập, %	4,21	3,02	4,30	6,34	4,84	5,21	4,50
Giới hạn tái lập (R) [$R = 2,8s_R$], %	0,106	0,079	0,112	0,157	1,31	1,45	1,29
^a 1,2,3 và 4: hỗn hợp thức ăn chăn nuôi với carbadox khoảng 1 % khối lượng; 5,6 và 7: premix với carbadox khoảng 10 % khối lượng.							

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] SOP A0394, *State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)*. Agricultural Research Department, The Netherlands.
 - [2] LowiE, Jr., D.M., TEAGUE, Jr., R.T., QUICK, F.E. and FOSTER, C.L. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1983, pp. 602-605.
 - [3] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*
 - [4] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.*
 - [5] TCVN 4325 (ISO 6497), *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.*
 - [6] AERTS, M.M.L. and WERDMULLER, G.A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1988, pp. 484-490.
-