

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 10811:2015

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI -
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG OLAQUINDOX -
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

Animal feeding stuffs - Determination of olaquindox content - High performance liquid chromatographic method

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 10811:2015 được xây dựng dựa theo Commission Regulation (EC) No. 152/2009;

TCVN 10811:2015 do Trung tâm Khảo, kiểm nghiệm và kiểm định giống vật nuôi, thức ăn 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 olaquinox – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

*Animal feeding stuffs – Determination of olaquinox content –
High performance liquid chromatographic method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng olaquinox (2-[N-2'-(hydroxyethyl) carbamoyl]-3-methylquinoxalin-N1,N4-dioxid) trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao pha đảo với detector UV.

Giới hạn định lượng của phương pháp là 5 mg/kg.

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

Olaquinox được chiết ra khỏi mẫu bằng hỗn hợp nước-metanol. Hàm lượng olaquinox được xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo với detector UV.

4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

TCVN 10811:2015

4.1 Metanol.

4.2 Metanol, loại dùng cho HPLC.

4.3 Nước, loại dùng cho HPLC.

4.4 Pha động dùng cho HPLC.

Hỗn hợp của nước (4.3) và metanol (4.2), tỷ lệ 900 : 100 (thể tích).

4.5 Chất chuẩn: olaquinox 2-[N-2'-(hydroxyethyl) carbamoyl]-3-methylquinoxalin-N¹,N⁴-dioxid tinh khiết, kí hiệu E 851.

4.5.1 Dung dịch chuẩn gốc olaquinox, 250 µg/ml

Cân 50 mg olaquinox, chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình định mức 200 ml (5.5) và thêm khoảng 190 ml nước. Sau đó, đặt bình vào bể siêu âm (5.1) khoảng 20 min. Sau khi xử lý bằng siêu âm, đưa dung dịch đến nhiệt độ phòng, thêm nước đến vạch và trộn. Bọc bình bằng giấy nhôm và bảo quản trong tủ lạnh. Dung dịch này bền được trong một tháng.

4.5.2 Dung dịch chuẩn trung gian olaquinox, 25 µg/ml

Chuyển 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc (4.5.1) vào bình định mức 100 ml (5.5), thêm pha động (4.4) đến vạch và trộn. Bọc bình bằng giấy nhôm và bảo quản trong tủ lạnh. Dung dịch này cần được chuẩn bị mới trong ngày sử dụng.

4.5.3 Dung dịch hiệu chuẩn

Chuyển 1,0 ml, 2,0 ml, 5,0 ml, 10,0 ml, 15,0 ml và 20,0 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.5.2) vào một dãy bình định mức 50 ml (5.5). Thêm pha động (4.4) đến vạch và trộn. Bọc bình bằng giấy nhôm. Các dung dịch này chứa nồng độ olaquinox tương ứng 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 7,5 µg/ml và 10,0 µg/ml.

Các dung dịch này cần được chuẩn bị mới trong ngày sử dụng.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Bể siêu âm.

5.2 Máy lắc cơ học.

5.3 Thiết bị HPLC.

5.3.1 Cột sắc kí lỏng, kích thước 250 mm x 4 mm, C18, cỡ hạt nhỏ 10 µm hoặc loại tương đương.

5.3.2 Detector UV có thể thay đổi bước sóng hoặc detector mảng diot.

5.4 Bộ lọc màng, cỡ lỗ 0,45 µm.

5.5 Bình định mức, dung tích 20 ml, 50 ml, 100 ml và 200 ml.

5.6 Bình nón, dung tích 250 ml và 1000 ml.

5.7 Cân, có thể cân được 50 mg, chính xác đến 0,1 mg.

5.8 Cân, có thể cân được 50 g, chính xác đến 0,01 g.

5.9 Pipet, có thể phân phối các thể tích thích hợp.

6 Lấy mẫu

Mẫu phải đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi chất lượng trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Nên lấy mẫu theo TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002) *Thực ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*.

7 Chuẩn bị mẫu thử

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

8 Cách tiến hành

CHÚ Ý: Olaquinox rất nhạy với ánh sáng. Thực hiện tất cả các thao tác dưới ánh sáng dịu hoặc sử dụng bình thủy tinh tối màu.

8.1 Yêu cầu chung

8.1.1 Mẫu trắng

Cần phân tích mẫu trắng để chắc chắn rằng không có mặt olaquinox hoặc chất gây nhiễu.

8.1.2 Kiểm tra độ thu hồi

Kiểm tra độ thu hồi bằng cách phân tích mẫu trắng được bổ sung một lượng olaquinox tương tự lượng dự kiến đó có mặt trong mẫu. Để bổ sung ở mức 50 mg/kg, chuyển 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc

TCVN 10811:2015

(4.5.1) vào bình nón 250 ml (5.6) và cho bay hơi dung dịch đến khoảng 0,5 ml. Thêm 50 g mẫu trắng, trộn kỹ và để 10 min, trộn lại vài lần trước khi tiếp tục chiết (8.2).

Mẫu trắng phải cùng loại với mẫu thử nhưng không phát hiện có mặt olaquinox.

8.2 Chiết

Cân khoảng 50 g mẫu, chính xác đến 0,01 g. Chuyển sang bình nón 1000 ml (5.6), thêm 100 ml metanol (4.1) và đặt bình vào bể siêu âm (5.1) trong 5 min. Thêm 410 ml nước và để lại vào bể siêu âm trong 15 min tiếp theo. Lấy bình ra khỏi bể siêu âm, lắc 30 min trên máy lắc (5.2) rồi lọc qua giấy lọc gấp nếp. Chuyển 10,0 ml dịch lọc sang bình định mức 20 ml, thêm nước đến vạch và trộn. Phần dịch nước được lọc qua bộ lọc màng (5.4). Tiếp tục xác định bằng HPLC (8.3).

8.3 Xác định bằng HPLC.

8.3.1 Thông số

Nên sử dụng các điều kiện sau đây, có thể sử dụng các điều kiện khác nếu cho kết quả tương đương:

- Cột phân tích (5.3.1);
- Pha động HPLC (4.4): Hỗn hợp metanol-nước, tỷ lệ 900:100 (thể tích);
- Tốc độ dòng: từ 1,5 ml/min đến 2 ml/min;
- Thể tích bơm: 20 µl đến 100 µl;
- Bước sóng phát hiện: 380 nm.

Kiểm tra sự ổn định của hệ thống sắc kí bằng cách bơm vài lần dung dịch hiệu chuẩn (4.5.3) có nồng độ 2,5 µg/ml, cho đến khi đạt được chiều cao (diện tích) pic và thời gian lưu ổn định.

8.3.2 Dụng đường chuẩn

Bơm mỗi dung dịch hiệu chuẩn (4.5.3) vài lần và xác định chiều cao (diện tích) pic trung bình đối với mỗi nồng độ. Dụng đường chuẩn bằng cách sử dụng chiều cao (diện tích) pic trung bình của dung dịch hiệu chuẩn trên trục tung và nồng độ tương ứng tính bằng µg/ml trên trục hoành.

8.3.3 Dung dịch mẫu

Bơm vài lần dịch chiết mẫu thu được trong 8.2, sử dụng cùng một thể tích như đã dùng đối với dung dịch hiệu chuẩn và xác định chiều cao (diện tích) trung bình của pic olaquinox.

Xác định nồng độ olaquinox có trong dung dịch mẫu từ chiều cao (diện tích) pic trung bình có trong dung dịch mẫu, tính bằng microgam trên mililit, sử dụng đường chuẩn (8.3.2).

9 Tính kết quả

Tính hàm lượng olaquinox trong mẫu, w (mg/kg), theo công thức sau:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

Trong đó:

c là nồng độ olaquinox trong dịch chiết mẫu (8.2) tính bằng microgam trên mililit ($\mu\text{g/ml}$);

1000 là thể tích dịch chiết đã pha loãng thu được từ 8.2 tương ứng với phần mẫu thử ban đầu (m), tính bằng mililit (ml);

m là khối lượng phần mẫu thử (8.2) tính bằng gam (g).

10 Đánh giá xác nhận kết quả

10.1 Nhận biết

Việc nhận biết chất phân tích có thể được khẳng định bằng đồng sắc kí hoặc sử dụng detector mảng diot để so sánh phổ đồ của dịch chiết mẫu (8.2) và của dung dịch hiệu chuẩn (4.5.3) có nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$.

10.1.1 Đồng sắc kí

Bổ sung một thể tích thích hợp dung dịch hiệu chuẩn (4.5.3) vào dịch chiết mẫu (8.2). Lượng olaquinox bổ sung phải xấp xỉ lượng olaquinox dự kiến tìm thấy trong dịch chiết mẫu.

Chỉ có chiều cao pic olaquinox tăng sau khi tính cả lượng bổ sung và độ pha loãng của dịch chiết. Sai khác về chiều rộng pic tại điểm giữa chiều cao phải nằm trong phạm vi $\pm 10\%$ chiều rộng gốc của pic olaquinox trong dịch chiết mẫu không thêm chuẩn.

10.1.2 Detector mảng diot

Các kết quả được đánh giá theo các tiêu chí sau:

a) tại bước sóng tương ứng với độ hấp thụ cực đại, phổ đồ của mẫu và của chất chuẩn, được ghi lại ở đỉnh cao nhất trên sắc kí đồ, phải giống nhau trong một biên độ được xác định bằng khả năng phân giải của hệ thống detector. Đối với detector mảng diot, biên độ đặc trưng là $\pm 2\text{ nm}$;

b) tại bước sóng từ 220 nm đến 400 nm, phổ đồ của mẫu và của chất chuẩn được ghi lại ở đỉnh cao nhất trên sắc kí đồ không được khác với các phần phổ đồ trong khoảng từ 10 % đến 100 % độ hấp thụ tương đối. Tiêu chí này đáp ứng khi có cùng phổ cực đại và độ lệch giữa hai phổ không vượt quá 15 % độ hấp thụ của chất phân tích chuẩn;

TCVN 10811:2015

c) tại bước sóng từ 220 nm đến 400 nm, phổ đồ của điểm uốn lên, đỉnh cao nhất và điểm uốn xuống của pic chất phân tích không được khác với các phần phổ đồ trong khoảng từ 10 % đến 100 % độ hấp thụ tương đối. Tiêu chí này đáp ứng khi có cùng phổ cực đại và độ lệch giữa hai phổ không vượt quá 15 % độ hấp thụ tương ứng với phổ đồ của đỉnh cao nhất.

Nếu một trong các tiêu chí này không đáp ứng thì không xác nhận được sự có mặt của chất phân tích trong mẫu.

11 Độ lặp lại và độ thu hồi

11.1 Độ lặp lại

Chênh lệch giữa kết quả của hai phép xác định song song, thực hiện trên cùng một mẫu không được vượt quá 15 % giá trị cao hơn khi hàm lượng olaquinox trong khoảng từ 10 mg/kg đến 200 mg/kg.

11.2 Độ thu hồi

Đối với các mẫu thức ăn chăn nuôi (mẫu trắng) được thêm chuẩn, độ thu hồi ít nhất là 90 %.

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, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử nghiệm cộng tác

Một nghiên cứu cộng tác đã được tổ chức thực hiện trên bốn mẫu thức ăn cho lợn bao gồm một mẫu trắng, có 13 phòng thử nghiệm tham gia thực hiện.

Kết quả của phép thử nghiệm cộng tác được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử nghiệm cộng tác

	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Mẫu 4
Số lượng phòng thử nghiệm	13	10	11	11
Số lượng kết quả đơn lẻ	40	40	44	44
Giá trị trung bình [mg/kg]	—	14,6	48,0	95,4
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r [mg/kg]	—	0,82	2,05	6,36
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R [mg/kg]	—	1,62	4,28	8,42
Hệ số biến thiên lặp lại, CV_r [%]	—	5,6	4,3	6,7
Hệ số biến thiên tái lập, CV_R [%]	—	11,1	8,9	8,8
Hàm lượng danh định [mg/kg]	—	15	50	100
Độ thu hồi, %	—	97,3	96,0	95,4