

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 12431:2018

EN 15791:2009

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI - XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG
DEOXYNIVALENOL - PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ
LỎNG HIỆU NĂNG CAO SỬ DỤNG DETECTOR UV
VỚI LÀM SẠCH BẰNG CỘT ÁI LỰC MIỄN NHIỄM**

*Foodstuffs - Determination of deoxyvinalenol in animal feed –
HPLC method with immunoaffinity column clean-up*

HÀ NỘI - 2018

Lời nói đầu

TCVN 12431:2018 hoàn toàn tương đương với EN 15791:2009;

TCVN 12431:2018 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F17
Thức ăn chăn nuôi biên soạn, 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 deoxynivalenol – Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng detector UV với làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm

*Foodstuffs – Determination of deoxynivalenol in animal feed –
HPLC method with immunoaffinity column clean-up*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để xác định hàm lượng deoxynivalenol (DON) nồng độ từ 150 µg/kg đến 4 000 µg/kg trong thức ăn chăn nuôi hỗn hợp.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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 (ISO 3696), *Nước dùng trong phân tích phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*.

3 Nguyên tắc

Deoxynivalenol (DON) được chiết ra khỏi mẫu bằng nước. Dịch chiết trong nước được làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm để loại bỏ các tạp chất. DON sau đó được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector UV.

4 Thuốc thử

Trong quá trình phân tích, chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hai lần hoặc nước loại 1 trong TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Dung môi hữu cơ phải đạt chất lượng dùng cho phân tích HPLC.

TCVN 12431:2018

4.1 Axetonitril

CẢNH BÁO – Axetonitril là chất nguy hại và khi xử lý phải thực hiện trong tủ hút. Phải mang thiết bị bảo vệ thích hợp (áo choàng, kính, găng tay).

4.2 Deoxynivalenol (DON), có độ tinh khiết tối thiểu là 97 % khối lượng

CẢNH BÁO – Deoxynivalenol là chất có tính độc cao. Luôn phải đeo găng tay và kính an toàn và phải tiến hành tất cả các giai đoạn chuẩn bị mẫu và chuẩn bị các chất chuẩn trong tủ hút.

4.3 Metanol

CẢNH BÁO – Metanol là chất độc và khi xử lý phải thực hiện trong tủ hút. Phải mang thiết bị bảo vệ thích hợp (áo choàng, kính, găng tay).

4.4 Axit axetic băng

CẢNH BÁO – Axit axetic băng là chất nguy hại và khi xử lý phải thực hiện bên trong tủ hút. Luôn phải mang thiết bị bảo vệ thích hợp (áo choàng, kính, găng tay).

4.5 Pha động

Trộn 15 phần thể tích metanol (4.3) với 84,9 phần thể tích nước và 0,1 phần thể tích axit axetic băng (4.4). Lượng chính xác metanol và axit axetic được sử dụng phụ thuộc vào cột HPLC được chọn để phân tích và phải được điều chỉnh, nếu cần. Loại khí dung dịch này trước khi sử dụng.

4.6 Dung môi rửa

Trộn 50 phần thể tích metanol (4.3) với 50 phần thể tích nước.

4.7 Dung dịch gốc DON, 250 µg deoxynivalenol/millilit axetonitril.

Cho 4,0 ml axetonitril (4.1) vào 5 mg DON (4.2) để tạo thành dung dịch có nồng độ 1,25 mg/ml. Pha loãng 1 000 µl dung dịch nồng độ 1,25 mg/ml đến 5,0 ml bằng axetonitril để tạo thành dung dịch gốc có nồng độ 250 µg/ml. Pha loãng 200 µl dung dịch gốc có nồng độ 250 µg/ml trong bình định mức 2,0 ml (5.11) bằng acetone để tạo thành dung dịch gốc pha loãng có nồng độ 25 µg/ml.

Để xác định nồng độ chính xác, ghi lại đường chuẩn độ hấp thụ của dung dịch gốc pha loãng có nồng độ 25 µg/ml này bằng máy đo quang phổ (5.15) trong dải bước sóng từ 200 nm đến 270 nm trong cuvet thạch anh có chiều dài đường quang 1 cm, sử dụng axetonitril (4.1) để so sánh. Xác định độ hấp thụ ở bước sóng 220 nm. Tính nồng độ khối lượng của deoxynivalenol, ρ_{DON} , tính bằng microgam trên millilit, sử dụng Công thức (1):

$$\rho_{\text{DON}} (\sim 250 \mu\text{g/ml}) = \frac{A_{\text{max}} \times M \times 100}{\kappa \times d} \quad (1)$$

Trong đó:

A_{max} là độ hấp thụ cực đại xác định được trên đường chuẩn độ hấp thụ (ở đây là: bước sóng 220 nm);

M là khối lượng mol của deoxynivalenol ($M = 296,3 \text{ g/mol}$);

κ là hệ số hấp thụ mol của deoxynivalenol trong axetonitril (4.1), (ở đây là: $681 \text{ m}^2/\text{mol} \pm 12,6 \text{ m}^2/\text{mol}$ [1]);

d là chiều dài đường quang của cuvet thạch anh, tính bằng xentimet (ở đây là: 1 cm).

Tính nồng độ khối lượng chính xác của dung dịch gốc có nồng độ 250 $\mu\text{g/ml}$ bằng Công thức (2):

$$\rho_{\text{DON}} (\sim 250 \mu\text{g/ml}) = \rho_{\text{DON}} (\sim 25 \mu\text{g/ml}) \times 10 \quad (2)$$

Dung dịch có thể được bảo quản nơi tối ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C, tối đa 3 tháng hoặc ở dưới -18 °C ít nhất 6 tháng.

CHÚ THÍCH: Việc chuẩn bị dung dịch gốc có thể được thực hiện theo phương pháp khối lượng bằng cách cân chính xác vật liệu chuẩn DON và dung môi được sử dụng để hòa tan nó.

4.8 Dung dịch thêm chuẩn DON

Dùng pipet lấy một lượng dung dịch gốc DON (4.7) đã hiệu chuẩn, tương đương 500 μg DON, cho vào bình định mức 5 ml (5.11). Thêm axetonitril (4.1) đến vạch để tạo thành dung dịch thêm chuẩn có nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$.

4.9 Dung dịch làm việc DON

Dùng pipet lấy dung dịch gốc DON (4.7) pha loãng đã hiệu chuẩn, tương đương 50 μg DON, cho vào bình định mức 5 ml (5.11). Thêm axetonitril (4.1) đến vạch để tạo thành dung dịch làm việc DON có nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$.

4.10 Dung dịch hiệu chuẩn DON

Các dung dịch chuẩn được chuẩn bị từ dung dịch làm việc DON có nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ (4.9). Ví dụ: cho các thể tích dung dịch làm việc DON có nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ (4.9) như trong bảng dưới đây vào các bình định mức 10 ml (5.11). Thêm pha động (4.5) đến vạch. Nồng độ dung dịch hiệu chuẩn có thể sai lệch miễn là mức thấp nhất cao hơn giới hạn phát hiện, mức cao nhất không gây ra bão hòa tín hiệu detector và có ít nhất hai mức ở giữa cách đều nhau.

Bảng 1 – Chuẩn bị các dung dịch chuẩn

Dung dịch hiệu chuẩn	Dung dịch làm việc (4.9) µl	Nồng độ DON ng/ml
1	450	450
2	375	375
3	300	300
4	225	225
5	150	150
6	75	75

4.11 Cột làm sạch ái lực miễn nhiễm DON

Các cột ái lực miễn nhiễm (IA) chứa các kháng thể đặc hiệu đối với deoxynivalenol. Cột phải có khả năng giữ được không ít hơn 2 500 ng DON và độ thu hồi không nhỏ hơn 70 % khi dùng 25 ng DON trong 1 ml đến 2 ml nước (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 **Cân phân tích**, có $d = 0,001$ g dùng để cân mẫu, $d = 0,01$ mg dùng để chuẩn bị dung dịch gốc DON (4.7).

5.2 **Máy đồng hóa/máy trộn tốc độ cao**.

5.3 **Máy lắc phòng thử nghiệm**.

5.4 **Máy trộn Vortex**, hoặc tương đương.

5.5 **Máy nghiền (có các sàng khác nhau)**.

5.6 **Máy trộn lắc**.

5.7 **Bình cầu có nắp vận**, dung tích 250 ml và 500 ml.

5.8 **Phễu**, có kích thước thích hợp.

5.9 **Bộ lọc**, cellulose cỡ lỗ 30 µm.

5.10 **Bộ lọc**, sợi thủy tinh không chứa chất kết dính, cỡ lỗ khoảng 2 µm.

5.11 **Bình định mức**, dung tích 2 ml, 5 ml và 10 ml.

5.12 Pipet chia vạch, dung tích 1 ml và 5 ml.

5.13 Pipet tự động hoặc xyranh thủy tinh kín khí có thể điều chỉnh được, dung tích 100 μ l và 1 000 μ l.

5.14 Hệ thống HPLC bao gồm:

5.14.1 Bơm, có khả năng tạo ra gradient nhị phân, không xung, với tốc độ dòng thích hợp cho cột phân tích.

5.14.2 Cột phân tích

Tất cả các cột có thể tách deoxynivalenol ra khỏi các thành phần gây nhiễu khác là thích hợp. Ví dụ: Cột Phenomenex ODS3-Prodigy (kích thước đường kính trong 15 cm \times 4,6 mm), cỡ hạt 5 μ m, cỡ lỗ 100 Å, cột Octadecylsilan (ODS) kích thước đường kính trong 250 mm \times 4,6 mm, cỡ hạt 3 μ m, cỡ lỗ 80 Å, cột Octadecyl (C18) kích thước đường kính trong 250 \times 4,6 mm, cỡ hạt 5 μ m, cỡ lỗ 180 Å.

5.14.3 Tiền cột (tùy chọn), thích hợp dùng cho cột phân tích được sử dụng.

5.14.4 Bộ lấy mẫu tự động, có khả năng bơm các thể tích thích hợp với độ lặp lại đảm bảo.

5.14.5 Detector UV, có khả năng đo ở bước sóng 220 nm.

5.14.6 Hệ thống thu thập dữ liệu.

5.15 Máy đo quang phổ UV, để kiểm tra nồng độ dung dịch gốc DON (4.7).

5.16 Bình chứa, có kích thước thích hợp với các khớp nối khí với các cột ái lực miễn nhiễm.

5.17 Lọ thủy tinh, có kích thước thích hợp dùng cho bộ lấy mẫu tự động (5.14.4) nhưng với dung tích tối thiểu là 2,0 ml.

5.18 Bộ lọc dạng xyranh, polyamid (nylon) có cỡ lỗ 0,45 μ m.

5.19 Bộ cô quay, có khả năng duy trì 50 °C với dòng không khí hoặc khí nitơ ổn định.

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm nhận được mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản. Các mẫu cần được lấy và chuẩn bị theo quy định hiện hành nếu có [2]. Các mẫu phải được nghiền mịn và trộn kỹ bằng máy nghiền (5.5) và máy trộn (5.6) hoặc bằng cách khác để đồng nhất hoàn toàn trước khi lấy phần mẫu thử để phân tích.

TCVN 12431:2018

Trong tất cả các trường hợp, nếu mẫu đông lạnh thì cần để mẫu rã đông hoàn toàn trước khi lấy mẫu. Trộn kỹ trước khi lấy phần mẫu thử để phân tích.

6.2 Chiết

Cân 25,0 g phần mẫu thử cho vào bình cầu có nắp vận dung tích 250 ml hoặc 500 ml (5.7). Thêm 200 ml nước đã loại ion, đậy nắp và lắc trong 1 h bằng máy lắc (5.3).

Chuẩn bị một phễu (5.8) với giấy lọc (5.9). Lọc mẫu đã chiết vào bình sạch có nắp vận dung tích 250 ml hoặc 500 ml (5.7).

6.3 Làm sạch bằng cột ái lực miễn nhiễm

Lắp bình chứa (5.16) vào cột ái lực miễn nhiễm (4.11). Thêm 8 ml nước đã loại ion. Sau đó chuyển 2,0 ml dịch đã chiết lọc (xem ở trên; 0,5 ml nếu kết quả phân tích trên 4 000 µg/kg, xem Điều 8) vào bình chứa (5.16). Để dung dịch này chảy chậm tự nhiên qua cột ở tốc độ 1 giọt/s đến 2 giọt/s. Khi dịch chiết chảy hết qua cột ái lực miễn nhiễm, cho 5 ml nước đã loại ion chảy qua cột. Loại bỏ chất lỏng còn lại bằng cách cho khí nitơ hoặc không khí đi qua cột trong khoảng 5 s. Loại bỏ tất cả các dịch rửa giải của bước làm sạch này.

Cuối cùng, đặt lọ lấy mẫu tự động HPLC (5.17) dưới cột và cho 0,5 ml metanol (4.3) chảy tự nhiên qua cột để thu dịch rửa giải. Sau khi các giọt metanol cuối cùng đi qua cột khoảng 1 min, thêm 1,0 ml metanol (4,3) khác và tiếp tục thu lấy dịch rửa giải. Cần thận cho khí nitơ hoặc không khí qua cột để thu lấy tất cả dịch rửa giải còn lại.

CHÚ THÍCH: Ngoài cách tiến hành thủ công (6.4) thì việc làm sạch và rửa giải cột ái lực miễn nhiễm có thể được thực hiện với bộ chuẩn bị mẫu tự động, với điều kiện thể tích và tốc độ dòng không đổi.

6.4 Chuẩn bị dung dịch thử để phân tích HPLC

Đặt lọ có chứa dịch rửa giải trong bộ cô quay (5.19) và cẩn thận để bay hơi đến khô dưới dòng khí nitơ hoặc không khí ở nhiệt độ khoảng 50 °C. Ngay sau đó, làm nguội lọ HPLC đến nhiệt độ môi trường và pha loãng lại phần cặn bằng 0,50 ml pha động HPLC (4.5). Trộn đều bằng máy trộn Vortex (5.4) trong ít nhất 30 s để đảm bảo lượng cặn được hòa tan hết. Trong trường hợp dịch lọc bị vẩn đục thì lọc dung dịch thử qua bộ lọc dạng xyranh (5.18).

6.5 Quy trình thêm chuẩn

Để xác định độ thu hồi thêm chuẩn cho vật liệu không chứa deoxynivalenol cùng các dung dịch thêm chuẩn (4.8). Mức thêm chuẩn phải trong dải hiệu chuẩn (tốt nhất là giữa dải). Để yên mẫu thêm chuẩn ít nhất 30 min để đảm bảo dung môi bay hơi.

7 Xác định bằng HPLC

7.1 Đường chuẩn

Dựng đường chuẩn vào đầu mỗi ngày phân tích bằng cách bơm các dung dịch hiệu chuẩn (4.10) ở các nồng độ thích hợp khác nhau vào máy sắc ký. Dựng đường chuẩn trước khi phân tích mẫu thử bằng cách dựng đồ thị nồng độ DON (ng/ml) (trục X) dựa theo tín hiệu pic như diện tích pic hoặc chiều cao pic (trục Y), xác định độ dốc và phân bố chặn bằng hồi quy tuyến tính và kiểm tra đồ thị để sử dụng chẩn đoán thích hợp.

7.2 Xác định deoxynivalenol trong dung dịch thử

Bơm các lượng dung dịch thử vào máy sắc ký, sử dụng cùng điều kiện đã dùng để dựng đường chuẩn.

7.3 Nhận biết pic

Nhận biết pic deoxynivalenol trong dung dịch thử bằng cách so sánh thời gian lưu của mẫu với thời gian lưu của dung dịch hiệu chuẩn HPLC (4.10) gần nhất được bơm vào mẻ phân tích HPLC. Nồng độ deoxynivalenol trong dung dịch thử phải nằm trong dải hiệu chuẩn. Nếu nồng độ deoxynivalenol trong dung dịch thử vượt quá nồng độ dung dịch hiệu chuẩn cao nhất thì phải pha loãng dung dịch thử bằng pha động HPLC để đưa nồng độ deoxynivalenol nằm trong dải hiệu chuẩn và phân tích lại. Hệ số pha loãng phải được đưa vào tất cả các tính toán tiếp theo.

7.4 Điều kiện hoạt động HPLC

Sử dụng thiết bị nêu trong 5.14 với các điều kiện dưới đây cho thấy tách tốt :

Thể tích bơm: 100 µl đến 300 µl

Bước sóng detector UV: 220 nm

Tốc độ dòng pha động (cột): 1,0 ml/min

Nếu máy bơm HPLC chuyển pha động (4.5) qua kênh A và dung môi rửa (4.6) qua kênh B thì quy trình gradient như sau:

Thời gian (min)	Kênh A (%)	Kênh B (%)
Từ 0 đến 15	100	0
Từ 15 đến 25	0	100
Từ 25 đến 35	100	0

CHÚ THÍCH: Pha động được chuẩn bị bằng axetonitril và nước cũng đã được chứng minh là các lựa chọn thay thế thích hợp. Các pha động như vậy có thể được sử dụng khi đã đạt được hiệu quả tách tốt.

8 Tính kết quả

Xác định từ đường chuẩn nồng độ khối lượng deoxynivalenol, tính bằng nanogram trên millilit (ng/ml), có trong dung dịch thử được bơm vào cột HPLC.

Tính phần khối lượng của deoxynivalenol, w_{DON} , bằng nanogram trên gam (ng/g) hoặc microgam trên kilogram ($\mu\text{g}/\text{kg}$), lấy kết quả đến một số thập phân, sử dụng Công thức (3):

$$w_{DON} = c_{DON} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{V_1}{m_s} \quad (3)$$

Trong đó:

c_{DON} là nồng độ khối lượng của deoxynivalenol được xác định trong quá trình hiệu chuẩn (7.1);

V_3 là tổng thể tích của dung dịch thử (0,5 ml, 6.4);

V_2 là thể tích của dịch chiết được dùng để làm sạch (2,0 ml hoặc 0,5 ml, 6.3);

V_1 là tổng thể tích dung môi chiết (200 ml, 6.2);

m_s là khối lượng của phần mẫu thử chiết được ($m_s = 25,0$ g, 6.2);

Công thức tính trên có thể được rút gọn nếu sử dụng khối lượng hoặc thể tích quy định:

$$w_{DON} = c_{DON} \times 2 \text{ (2 ml dịch chiết đã được làm sạch)} \quad (4)$$

Nếu công thức tính trên cho giá trị lớn hơn 500 thì cần chuẩn bị lần làm sạch mới với 0,5 ml dịch chiết mẫu (xem 6.3). Công thức trên được rút gọn như sau:

$$w_{DON} = c_{DON} \times 8 \text{ (0,5 ml dịch chiết đã được làm sạch)} \quad (5)$$

9 Độ chụm

9.1 Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Chi tiết nghiên cứu liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Tài liệu tham khảo [1]. Các giá trị thu được từ nghiên cứu liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và /hoặc nền mẫu khác với các dải nồng độ và /hoặc nền mẫu đã nêu.

9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại r .

$\bar{x} = 229 \mu\text{g/kg}$	$r = 87,5 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 401 \mu\text{g/kg}$	$r = 97,2 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 188 \mu\text{g/kg}$	$r = 31,9 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 505 \mu\text{g/kg}$	$r = 233,2 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 1\ 013 \mu\text{g/kg}$	$r = 232,9 \mu\text{g/kg}$

9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, được báo cáo bởi hai phòng thử nghiệm, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập R .

$\bar{x} = 229 \mu\text{g/kg}$	$R = 100,6 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 401 \mu\text{g/kg}$	$R = 184,7 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 188 \mu\text{g/kg}$	$R = 132,8 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 505 \mu\text{g/kg}$	$R = 329,2 \mu\text{g/kg}$
$\bar{x} = 1\ 013 \mu\text{g/kg}$	$R = 299,0 \mu\text{g/kg}$

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu (loại mẫu, nguồn gốc mẫu, ký hiệu);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và kiểu quy trình lấy mẫu (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- kết quả thử nghiệm và các đơn vị biểu thị;
- hoặc độ lặp lại đã được xác nhận;
- điểm cụ thể quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Dữ liệu độ chụm

Các dữ liệu dưới đây thu được trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm [3] phù hợp với Hướng dẫn của AOAC về các quy trình nghiên cứu cộng tác để đánh giá, xác nhận các đặc tính của phương pháp phân tích [4].

Bảng A.1 – Các kết quả thu được từ nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

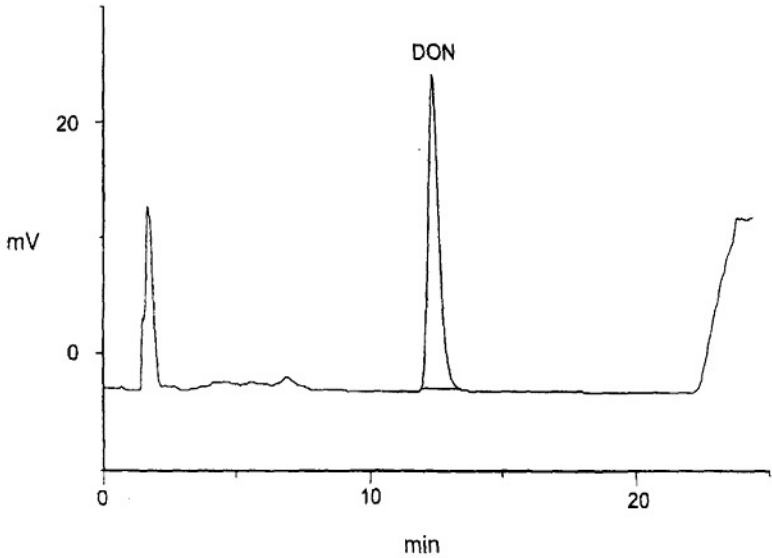
Mẫu	Thức ăn chăn nuôi	Thức ăn chăn nuôi	Thức ăn chăn nuôi	Thức ăn chăn nuôi	Thức ăn chăn nuôi	Thức ăn chăn nuôi
Năm thử nghiệm liên phòng	2005	2005	2005	2005	2005	2005
Số lượng phòng thử nghiệm	11	11	13	13	13	12
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	10	12	11	13	12
Số lượng phòng thử nghiệm ngoại lệ	1	1	1	2	0	0
Số lượng các kết quả được chấp nhận	10	10	12	11	13	12
Giá trị trung bình \bar{x} , $\mu\text{g/kg}$	229	401	< 30	188	505	1 013
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , $\mu\text{g/kg}$	31,2	34,7	n.a. ^c	11,4	83,3	83,2
Hệ số biến thiên lặp lại, $CV(r)$, %	13,7	8,7	n.a. ^c	6,1	16,5	8,2
Giới hạn lặp lại r^a , $\mu\text{g/l}$	87,5	97,2	n.a. ^c	31,9	233,2	232,9
Độ lệch chuẩn tái lập s_R , $\mu\text{g/kg}$	35,9	66,0	n.a. ^c	47,4	117,6	106,8
Hệ số biến thiên tái lập, $CV(R)$, %	15,7	16,5	n.a. ^c	25,2	23,3	10,5
Giá trị horat	0,8	0,9	n.a. ^c	1,2	1,3	0,7
Giới hạn tái lập, R^b , $\mu\text{g/l}$	100,6	184,7	n.a. ^c	132,8	329,2	299,0
Độ thu hồi, %	100	93	n.a. ^c	n.a. ^c	n.a. ^c	n.a. ^c
^a – $r = 2,8 \times s_r$ ^b – $R = 2,8 \times s_R$ ^c – không áp dụng						

Bảng A.2 – Thành phần nguyên liệu

Vật liệu thứ	Thành phần	Khối lượng (kg)	Thành phần nguyên liệu ¹
Mẫu trắng	Yến mạch (đã bỏ vỏ)	1,5	Yến mạch
	Yến mạch (đen)	1,5	Yến mạch
	Hạt đậu tương	1,5	Đậu tương
	Thức ăn cho thỏ	1,5	Hỗn hợp ngũ cốc, cà rốt
	Hỗn hợp thức ăn cho chim	3	Hạt hướng dương, ngô, yến mạch, lúa mì, hạt đại, hạt cải dầu
Mức 1	Thức ăn hỗn hợp cho lợn	8	Đậu Hà Lan, đậu tương, lúa mì, lúa mạch, sắn, hạt bắp cải, mỡ động vật, ngô, canxi cacbonat
Mức 2	Thức ăn hỗn hợp cho ngựa	8	Mảnh lúa mạch, mảnh yến mạch, mảnh ngô, dầu thực vật, cỏ alfalfa, viên nén hỗn hợp dùng cho ngựa
Mức 3	Thức ăn cho ngựa	2	Yến mạch, mảnh lúa mạch, mảnh ngô, đậu Hà Lan, mật mía, dầu thực vật
	Thức ăn cho thỏ	2	Lúa mì, cỏ alfalfa, hạt hướng dương, hạt bắp cải, ri rơm, lúa mạch, đậu nành rang
	Thức ăn hỗn hợp cho lợn	4	Đậu Hà Lan, lúa mì, lúa mạch, sắn, hạt bắp cải, mỡ động vật, ngô, canxi cacbonat
	Cỏ ngọt cho ngựa	0,5	Thành phần chưa biết cùng với cà rốt và vitamin A, D ₃ và E
	Cỏ alfalfa	1	Cỏ alfalfa
	Lúa mì	0,7	Lúa mì
	Hỗn hợp đậu tương/ngô	2	Đậu tương/ngô, tỷ lệ mỗi loại 50 %

¹ Với khối lượng giảm.

Phụ lục B
(Tham khảo)
Sắc ký đồ



Hình B.1 – Mẫu thức ăn chăn nuôi bị nhiễm tự nhiên ở nồng độ khoảng 2 mg/kg

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Krska, R., et al., Determination of molar absorptivity coefficients for major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. *Anal Bioanal Chem*, 2007. **388**(5-6): p.1215-1226
 - [2] EC, COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2006. **49**(L70): p. 12-34
 - [3] Stroka, J., et al., Liquid Chromatographic Determination of Deoxynivalenol in Baby Food and Animal Feed: Interlaboratory Study. *J AOAC Int*, 2006. **89**(4): p. 1012-1020
 - [4] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51
-