

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 B₁. 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 sử 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 – Định tính zearalenone

Animal feeding stuffs – Qualitative determination of zearalenone

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính zearalenone trong thức ăn chăn nuôi và đặc biệt là trong ngô. Phương pháp này chỉ dùng cho mục đích sàng lọc.

Giới hạn của phép xác định zearalenone là khoảng 50 µg/kg.

CHÚ THÍCH Mặc dù lúa miến cho các vết huỳnh quang nhiều giống các vết huỳnh quang của zearalenone, nhưng phương pháp này vẫn có thể áp dụng cho thức ăn chăn nuôi vì giá trị R_f khác nhau sau khi phát triển sắc phổ theo chiều thứ hai. Các vết chấm này không được triển khai bằng kỹ thuật khẳng định riêng.

2 Nguyên tắc

Phần mẫu thử được chiết bằng hỗn hợp của axetonitril và dung dịch kali clorua sau đó được lọc và phần dịch lọc được khử béo bằng isooctan, sau đó được tinh sạch bằng hỗn hợp axetonitril, nước và chì axetat với sự có mặt của diatomit. Sau khi lọc, phần dịch lọc được chiết bằng cloroform sau đó cho bay hơi.

Chất chiết khô được hòa tan trong hỗn hợp của benzen và axetonitril. Tiến hành sắc ký lớp mỏng hai chiều trên một phần của dung dịch này. Hàm lượng zearalenone xác định được bằng cách quan sát hoặc đo cường độ huỳnh quang của vết chấm dưới ánh sáng tử ngoại bằng cách so sánh với cường độ huỳnh quang của một lượng zearalenone đã biết được thực hiện trên cùng một bản sắc ký.

Việc nhận biết zearalenone được khẳng định bằng cách sử dụng thuốc thử benzidin bis-diazo hóa.

3 Thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

3.1 Axetonitril.

3.2 Isooctan.

3.3 Cloroform.

CẢNH BÁO – Cloroform là chất độc. Tránh hít và tiếp xúc với cloroform. Làm việc trong tủ hút khí độc khi xử lý dung môi và các dung dịch của chúng.

3.4 Benzen/axetonitril, hỗn hợp 98 + 2, tính theo thể tích.

CẢNH BÁO – Benzen độc khi hít phải và tiếp xúc với da và rất dễ cháy.

3.5 Dung môi triển khai.

3.5.1 Toluen/etyl axetat/ axit fomic, hỗn hợp 6 + 3 + 1, tính theo thể tích.

3.5.2 Clorofom/etanol, hỗn hợp 95 + 5, tính theo thể tích.

3.6 Kali clorua, dung dịch 40 g/l.

3.7 Dung dịch chì axetat, được chuẩn bị như sau:

Cân 200 g chì axetat cho vào bình định mức một vạch 1000 ml, thêm 3 ml axit axetic, pha loãng bằng nước đến vạch và trộn.

3.8 Thuốc thử benzidin bis-diazo hóa, được chuẩn bị như sau

CẢNH BÁO – Benzidin là chất gây ung thư, gây độc khi hít vào, tiếp xúc với da và nuốt phải.

3.8.1 Chuẩn bị dung dịch benzidin 5 g/l

Lấy 0,5 g benzidin cho vào bình 100 ml có chứa 20 ml nước và 1,5 ml axit clohydric và thêm nước đến vạch.

Bảo quản dung dịch này trong chai thủy tinh màu nâu tránh ánh sáng.

3.8.2 Chuẩn bị thuốc thử

Làm nguội các thể tích bằng nhau của dung dịch benzidin (3.8.1) và dung dịch natri nitrit 100 g/l đến khoảng từ 0 °C đến 5 °C.

Trộn kỹ hai dung dịch này. Dung dịch thu được có màu tím sẫm và đục. Đưa dung dịch này về nhiệt độ phòng (màu vàng) trước khi sử dụng.

Chuẩn bị thuốc thử này ngay trước khi sử dụng

3.9 Diatomit (celit 545), đã được rửa bằng axit clohydric

3.10 Nitơ.

3.11 Zearalenone, dung dịch chuẩn có nồng độ 10 µg/ml trong benzen.

Xác định phổ hấp thụ của dung dịch trong dải bước sóng từ 300 nm đến 330 nm bằng máy đo phổ, sử dụng cuvet quang học thạch anh 10 mm và sử dụng benzen làm chất đối chứng. Ghi lại độ hấp thụ tối đa, A, gần với bước sóng 317 nm.

Tính nồng độ zearalenone của dung dịch bằng miligam trên mililit (mg/ml), sử dụng công thức sau:

$$\frac{318 \times A \times 1000}{6060}$$

Trong đó:

318 là khối lượng phân tử của zearalenone;

6 060 là hệ số tắt phân tử.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Máy nghiền, thích hợp để chuẩn bị sản phẩm sao cho lọt hết qua rây cỡ lỗ là 1 mm.

4.2 Máy lắc, có thể thực hiện 100 dao động trong mỗi phút.

4.3 Giấy lọc, loại trung bình (giấy lọc nhanh sẽ làm cho dung dịch đục, giấy loại chậm sẽ làm cho giấy dễ bị tắc).

4.4 Bộ cô quay có bình cầu đáy tròn.

4.5 Thiết bị dùng cho sắc ký lớp mỏng, ví dụ: thiết bị cần thiết để chuẩn bị bản sắc ký (4.6) và dụng cụ chấm (pipet mao quản hoặc microxyranh), bề triển khai sắc ký, và dụng cụ phun thuốc thử (3.8) lên các bản sắc ký.

4.6 Bản thủy tinh dùng cho sắc ký lớp mỏng, kích thước 200 mm x 200 mm, được chuẩn bị như sau (lượng này chỉ vừa đủ để chuẩn bị 5 bản).

Cân 30 g silica gel G-HR cho vào bình nón, thêm 60 ml nước, đậy kín và trộn kỹ trong 1 min. Dàn đều thành một lớp trên bản sắc ký sao cho tạo thành một lớp dày đều 0,25 mm. Để khô trong không khí và

TCVN 9131:2011

bảo quản các bản sắc ký này trong bình hút ẩm. Hoạt hóa bản sắc ký trước khi sử dụng bằng cách đặt chúng trong tủ sấy, duy trì ở $110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 1 h.

Có thể sử dụng các bản sắc ký đã chuẩn bị có bán sẵn trên thị trường nếu cho các kết quả tương đương với kết quả thu được từ các bản sắc ký được chuẩn bị ở phần trên.

4.7 Đèn UV bước sóng ngắn (bước sóng 253 nm)

Cường độ của tia sáng phải đạt được sao cho phân biệt rõ chấm 25 ng của zearalenone trên bản sắc ký lớp mỏng khi đèn được đặt cách bản sắc ký 100 mm.

CẢNH BÁO – Do ánh sáng UV rất có hại cho mắt, cần mang kính bảo vệ mắt.

4.8 Ống nghiệm, dung tích 10 ml, có nắp bằng polyetylen.

4.9 Máy đo huỳnh quang (tùy chọn, nhưng nên có).

4.10 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.11 Bình nón, dung tích 500 ml, có nút thủy tinh mài.

4.12 Phễu chiết, dung tích 250 ml.

4.13 Ống đong, dung tích 100 ml và 250 ml.

4.14 Pipet, dung tích 50 ml và 100 ml.

4.15 Microxyranh.

5 Lấy mẫu

Lấy mẫu phòng thử nghiệm đối với sản phẩm cần kiểm tra theo tiêu chuẩn thích hợp liên quan đến sản phẩm, trừ khi việc lấy mẫu để xác định zearalenone không bao gồm trong áp dụng. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể hiện hành, thì các bên liên quan sẽ thỏa thuận về vấn đề này, có tính đến các đặc tính của sản phẩm cần lấy mẫu

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Nghiền mẫu sao cho có thể lọc hết qua rây có cỡ lỗ 1 mm. Trộn kỹ.

6.2 Phần mẫu thử

Cân 50 g mẫu thử cho vào bình nón 500 ml (4.11), chính xác đến 0,01 g.

6.3 Chiết

Dùng ống đong (4.13) thêm cẩn thận 180 ml axetonitril (3.1) và 20 ml dung dịch kali clorua (3.6) vào bình. Đậy bình, trộn và lắc 30 min bằng máy lắc (4.2). Lọc qua giấy lọc (4.3).

Dùng pipet (4.14) chuyển 100 ml dịch lọc vào phễu chiết (4.12) và loại chất béo bằng cách chiết hai lần liên tục mỗi lần dùng 50 ml isooctan (3.2).

Thu lấy pha axetonitril vào bình cầu đáy tròn của bộ cô quay (4.4) và cho bay hơi đến khô dưới áp suất giảm.

6.4 Tinh sạch

Dùng ống đong (4.13) thêm cẩn thận 20 ml axetonitril (3.1), 60 ml nước và 20 ml dung dịch chì axetat (3.7) vào lượng còn lại thu được sau khi bay hơi. Trộn và để tách pha 10 min trong nồi cách thủy (4.10) duy trì ở 60 °C. Kết tủa được tạo thành. Thêm 5 g diatomit (3.9) và lọc qua giấy lọc (4.3).

Dùng pipet (4.14) chuyển 50 ml dịch lọc vào phễu chiết và thực hiện chiết ba lần liên tiếp, mỗi lần dùng 50 ml cloroform (3.3). Làm khô các phần cloroform trên natri sulfat. Thu các phần cloroform trong bình cầu đáy tròn của bộ cô quay (4.4) và làm bay hơi gần như đến khô dưới áp suất giảm.

Chuyển lượng còn lại sau khi bay hơi vào ống nghiệm (4.8) dùng cloroform để tráng rửa, sau đó làm bay hơi đến khô dưới dòng khí nitơ (3.10) trên nồi cách thủy (4.10).

Cẩn thận dùng microxyranh thêm 0,5 ml hỗn hợp benzen/axetonitril (3.4) và đậy chặt nắp ống nghiệm.

6.5 Sắc ký lớp mỏng hai chiều

6.5.1 Sử dụng các dung dịch (xem Hình 1)

Vạch lên bản sắc ký (4.6) hai đường thẳng song song sát với hai cạnh liền kề (ở 50 mm và 60 mm tương ứng tính từ các cạnh) để đánh dấu giới hạn dịch chuyển của dung môi phía trước. Đưa các dung dịch sau đây lên bản sắc ký bằng cách dùng microxyranh.

- ở điểm A, 25 µl dịch chiết đã tinh sạch (6.4);
- ở điểm B, 10 µl dung dịch chuẩn (3.11);
- ở điểm C, 5 µl dung dịch chuẩn (3.11);

TCVN 9131:2011

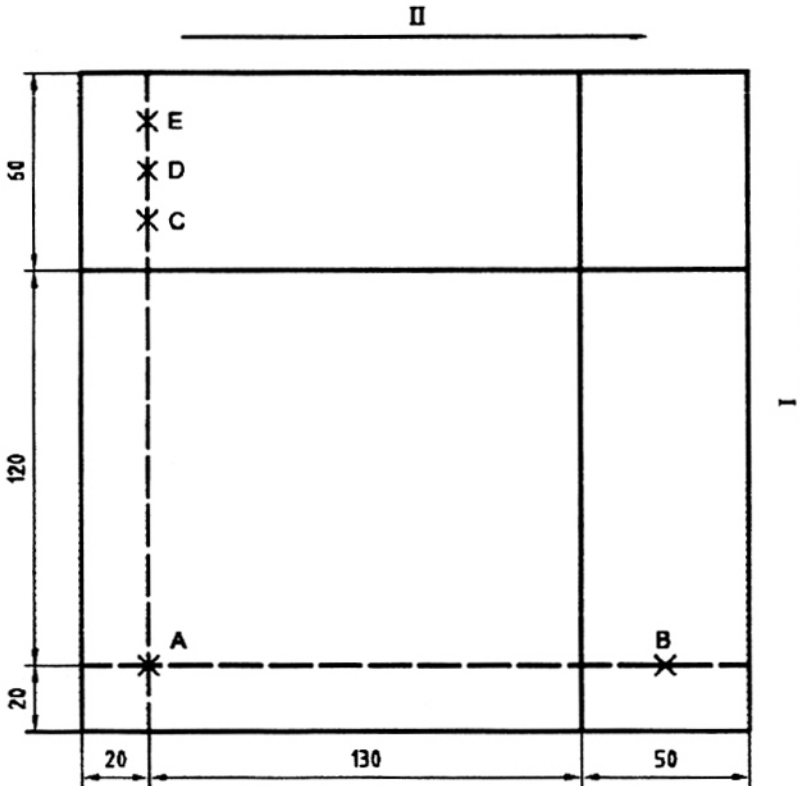
- ở điểm D, 10 μ l dung dịch chuẩn (3.11);
- ở điểm E, 15 μ l dung dịch chuẩn (3.11).

Làm khô dưới dòng không khí hoặc nitơ. Các vết chấm thu được phải có đường kính khoảng 5 mm.

6.5.2 Khai triển

Phát triển sắc phổ theo hướng I sử dụng dung môi khai triển (3.5.1) (lớp 10 mm trong bể bão hòa) tránh ánh sáng, cho đến khi dung môi đạt được vạch đánh dấu. Lấy bản sắc ký ra khỏi bể và để khô ít nhất 15 min ở nhiệt độ môi trường, tránh ánh sáng.

Để thuận tiện hơn, sau khi khai triển theo hướng I, quan sát sắc phổ nhanh dưới ánh sáng tử ngoại 253 nm và khoanh các chấm zearalenone nhanh bằng bút chì (chấm ở điểm B cho thấy vị trí của zearalenone).



Hình 1 – Chấm mẫu và triển khai sắc ký đồ

Sau đó, khai triển sắc ký theo hướng II sử dụng dung môi triển khai (3.5.2) (lớp 10 mm trong bể chưa bão hòa) tránh ánh sáng, cho đến khi dung môi đến vạch đánh dấu. Lấy bản sắc ký ra khỏi bể và để khô ở nhiệt độ môi trường, tránh ánh sáng.

6.6 Xác định

6.6.1 Yêu cầu chung

Có thể sử dụng hai phương pháp xác định: quan sát bằng mắt thường hoặc đo mật độ huỳnh quang. Nếu có sẵn máy đo mật độ huỳnh quang thì nên dùng phương pháp này.

6.6.2 Quan sát bằng mắt thường

Xác định lượng zearalenone trong điểm chấm mẫu bằng cách so sánh cường độ huỳnh quang dưới ánh sáng UV của điểm chấm từ chất chiết với cường độ của các điểm chấm C, D và E của dung dịch chuẩn, với các bản sắc ký được đặt cách đèn UV (4.7) 10 cm. Dùng phương pháp nội suy, nếu cần.

Nếu cường độ huỳnh quang của điểm chấm 25 µl của chất chiết lớn hơn so với điểm chấm 15 µl dung dịch chuẩn, thì dùng một thể tích nhỏ hơn ở điểm A hoặc pha loãng chất chiết với hỗn hợp benzen/axetonitril (3.4) và lặp lại sắc ký lớp mỏng (6.5).

6.6.3 Đo mật độ huỳnh quang

Đo cường độ huỳnh quang của các chấm sử dụng máy đo mật độ huỳnh quang (4.9), ví dụ, ở bước sóng kích thích 313 nm và bước sóng phát xạ 443 nm (bước sóng phát xạ cực đại ở 470 nm).

Xác định hàm lượng zearalenone của chấm mẫu bằng cách so sánh cường độ huỳnh quang của điểm chấm từ chất chiết với cường độ của các điểm chấm C, D và E từ dung dịch chuẩn.

6.7 Phép khẳng định zearalenone

Phun thuốc thử benzidin bis-diazo hóa (3.8) lên các bản sắc ký thu được trong 6.5. Zearalenone cho chấm màu gạch đỏ tươi ở nhiệt độ phòng, nhạt dần sau khi tiếp xúc với không khí trong ít nhất 15 min.

7 Biểu thị kết quả

7.1 Phương pháp quan sát bằng mắt thường

Hàm lượng zearalenone, biểu thị bằng microgam trên kilogam sản phẩm, tính được bằng công thức sau:

$$\frac{c \times V_1 \times V_3}{m \times V_2}$$

Trong đó:

c là nồng độ zearalenone của dung dịch chuẩn (3.11), tính bằng microgam trên mililit (µg/ml);

m là khối lượng phần mẫu thử tương ứng với thể tích chất chiết phụ thuộc vào quá trình tinh sạch (12,5 g), tính bằng gam (g);

TCVN 9131:2011

V_1 là thể tích cuối cùng của dịch chiết có tính đến các khả năng pha loãng, tính bằng microlit (μl);

V_2 và V_3 là các thể tích tương ứng của chất chiết và của dung dịch chuẩn zearalenone (3.11) được áp dụng cho bản sắc ký, cho các cường độ huỳnh quang tương tự, tính bằng microlit (μl).

7.2 Phép đo bằng máy đo mật độ huỳnh quang

Hàm lượng zearalenone, biểu thị bằng microgam trên kilogram sản phẩm, tính theo công thức sau:

$$\frac{m_1 \times V_1}{m \times V_2}$$

Trong đó:

m là khối lượng phần mẫu thử (trong trường hợp này là 12,5 g) tương ứng với thể tích chất chiết phụ thuộc vào quá trình tinh sạch (12,5 g), tính bằng gam (g);

m_1 là khối lượng của zearalenone trong chám chất chiết (có tính đến thể tích V_2), suy ra từ các phép xác định, tính bằng nanogam (ng);

V_1 là thể tích cuối cùng của dịch chiết có tính đến các khả năng loãng, tính bằng microlit (μl);

V_2 là thể tích của dịch chiết được đưa vào bản sắc ký (trong trường hợp này là 25 μl), tính bằng microlit (μl).

8 Độ chụm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Phụ lục A. Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, cũng như viện dẫn tiêu chuẩn này;
- phương pháp xác định đã sử dụng (quan sát bằng mắt thường hoặc sử dụng máy đo huỳnh quang);
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng thử nghiệm quốc tế gồm có 20 phòng thử nghiệm tham gia (chỉ 16 phòng thử nghiệm trong số đó cung cấp kết quả có thể sử dụng cho ngô B) mỗi phòng thử nghiệm tiến hành ba phép xác định, cho các kết quả thống kê (đánh giá theo ISO 5725:1986¹⁾) cho dữ liệu nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Kết quả thử nghiệm liên phòng

Mẫu	Ngô A	Ngô B (mẫu ngô A được pha loãng đến 1/3)
Số lượng các phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	20	15
Trung bình, $\mu\text{g}/\text{kg}$	734	219
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , $\mu\text{g}/\text{kg}$	78	34
Hệ số biến thiên lặp lại, %	11	15
Giới hạn lặp lại, r ($2,83 s_r$), $\mu\text{g}/\text{kg}$	221	96
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , $\mu\text{g}/\text{kg}$	282	125
Hệ số biến thiên tái lập, %	38	57
Giới hạn tái lập, R ($2,83 s_R$), $\mu\text{g}/\text{kg}$	798	354

¹⁾ ISO 5725 (đã được huỷ bỏ) được sử dụng để thu dữ liệu về độ chụm.