

Thức ăn chăn nuôi – Xác định hàm lượng tryptophan

Animal feeding stuffs – Determination of tryptophan content

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp xác định hàm lượng tryptophan tự do và tổng số trong thức ăn chăn nuôi (ví dụ: thức ăn hoàn chỉnh và thức ăn bổ sung, nguyên liệu thô, nguyên liệu trong hỗn hợp, sản phẩm premix, thức ăn đậm đặc...). Không phân biệt giữa dạng D- và L-.

2 Nguyên tắc

Để xác định tryptophan tổng số, thủy phân mẫu trong môi trường kiềm bằng dung dịch bari hydroxit bão hòa và đun nóng đến 110 °C trong 20 giờ. Sau khi thủy phân, bổ sung chất nội chuẩn.

Để xác định tryptophan tự do, chiết mẫu trong môi trường axit nhẹ với sự có mặt của chất nội chuẩn.

Tryptophan và chất nội chuẩn trong dịch thủy phân hoặc dịch chiết được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo cột C₁₈ có phát hiện huỳnh quang.

3 Thuốc thử và vật liệu

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

3.1 Nước cất hai lần, hoặc nước có độ tinh khiết tương đương (độ dẫn điện < 10 µS/cm).

3.2 Chất chuẩn: tryptophan (tinh khiết/hàm lượng ≥ 99 %) được làm khô trong điều kiện chân không qua phospho pentoxit.

3.3 Chất nội chuẩn: α-metyltryptophan (tinh khiết/ hàm lượng ≥ 99 %) được làm khô trong điều kiện chân không qua phospho pentoxit.

3.4 Bari hydroxit octahydrat

Cẩn thận không để Ba(OH)₂.8H₂O tiếp xúc lâu trong không khí để tránh hình thành BaCO₃, mà có thể gây cản trở phép xác định (xem B.3).

3.5 Natri hydroxit.

3.6 Axit orthophosphoric, $w = 85 \%$.

3.7 Axit clohydric đậm đặc, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.

3.8 Metanol, loại dùng cho HPLC.

3.9 Xăng nhẹ, có khoảng sôi từ 40°C đến 60°C .

3.10 Dung dịch natri hydroxit, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Hoà tan 40,0 g NaOH (3.5) trong nước (3.1) và thêm nước (3.1) cho đến 1 lít.

3.11 Axit clohydric, $c = 6 \text{ mol/l}$.

Lấy 492 ml HCl (3.7) và thêm nước (3.1) cho đến 1 lít.

3.12 Axit clohydric, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Lấy 82 ml HCl (3.7) và thêm nước (3.1) cho đến 1 lít.

3.13 Axit clohydric, $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

Lấy 8,2 ml HCl (3.7) và thêm nước (3.1) cho đến 1 lít.

3.14 Axit orthophosphoric, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

Lấy 34 ml axit orthophosphoric (3.7) và thêm nước (3.1) cho đến 1 lít.

3.15 Dung dịch tryptophan đậm đặc (3.2), $c = 0,000\ 5000 \text{ g/ml}$.

Hoà tan 0,25 g tryptophan (3.2) (đã cân chính xác đến 0,1 mg) trong axit clohydric (3.13) vào bình định mức 500 ml và thêm axit clohydric (3.13) cho đến vạch. Bảo quản dung dịch này ở nhiệt độ -18°C tối đa là bốn tuần.

3.16 Dung dịch nội chuẩn đậm đặc, $c = 0,000\ 54 \text{ g/ml}$.

Hoà tan 0,27 g α -methyltryptophan (3.3) (đã cân chính xác đến 0,1 mg) trong axit clohydric (3.13) vào bình định mức 500 ml và thêm axit clohydric (3.13) cho đến vạch. Bảo quản ở nhiệt độ -18°C tối đa là bốn tuần.

3.17 Dung dịch chuẩn hiệu chuẩn của tryptophan và chất nội chuẩn

Lấy 2,00 ml dung dịch tryptophan đậm đặc (3.15) và 2,00 ml dung dịch nội chuẩn đậm đặc (α -methyltryptophan) (3.16). Pha loãng bằng nước (3.1) và metanol (3.8) đến cùng một thể tích và cùng một nồng độ của metanol (10 % đến 30 %) khi kết thúc thủy phân.

Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng.

Trong quá trình chuẩn bị, bảo vệ tránh ánh nắng trực tiếp của mặt trời.

3.18 Etanolamin > 98 %.

3.19 Dung dịch 1,1,1-tricloro-2-metyl-2-propanol.

Cho 1 g dung dịch 1,1,1-tricloro-2-metyl-2-propanol vào 100 ml metanol (3.8).

3.20 Pha động dùng cho HPLC.

Hoà tan 3,00 g axit axetic vào trong 900 ml nước (3.1) và thêm 50,0 ml dung dịch 1,1,1-tricloro-2-metyl-2-propanol (3.19). Sử dụng etanolamin (3.18) để chỉnh pH đến 5,00. Thêm nước (3.1) cho đến 1 000 ml.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Thiết bị HPLC có detector đo phổ huỳnh quang.

4.2 Cột sắc ký lỏng, 125 mm x 4 mm, được nhồi bằng C_{18} , 3 μ m, hoặc tương đương.

4.3 Máy đo pH.

4.4 Bình polypropylen, dung tích 125 ml, có cổ rộng và nắp vặn.

4.5 Bộ lọc màng, 0,45 μ m.

4.6 Nồi hấp áp lực, có khả năng duy trì ở $(110 \pm 2) ^\circ\text{C}$, $[(140 \pm 10) \text{ kPa } (1,4 \pm 0,1) \text{ bar}]$.

Đĩa có nắp đậy kín áp suất có thể để trong tủ sấy có khả năng điều chỉnh đến $(110 \pm 2) ^\circ\text{C}$ có thể được sử dụng.

4.7 Máy khuấy từ hoặc máy lắc cơ học.

4.8 Máy trộn Vortex.

5 Cách tiến hành

5.1 Chuẩn bị mẫu

Nghiên mẫu sao cho lọt hết qua sàng 0,5 mm. Các mẫu có độ ẩm cao phải được làm khô trong không khí ở nhiệt độ không quá $50 ^\circ\text{C}$ hoặc được làm đông khô trước khi nghiền. Các mẫu có hàm lượng chất béo cao phải được chiết bằng xăng nhẹ (3.9) trước khi nghiền.

5.2 Xác định tryptophan tự do (dịch chiết)

Cân một lượng thích hợp (1 g đến 5 g) mẫu đã chuẩn bị (5.1) chính xác đến 1 mg cho vào bình nón. Thêm 100,0 ml axit clohydric (3.13) và 5,00 ml dung dịch nội chuẩn đậm đặc (3.16). Sử dụng máy khuấy từ hoặc máy lắc cơ học (4.7) để lắc hoặc trộn trong 60 phút. Để lắng và dùng pipet lấy 10,0 ml dung dịch nổi phía trên cho vào cốc có mỏ. Thêm 5 ml axit orthophosphoric (3.14). Dùng natri hydroxit (3.10) chỉnh pH đến 3,0. Cho một lượng metanol (3.8) đủ để có được nồng độ metanol khoảng 10 % đến 30 % trong thể tích cuối cùng. Chuyển một thể tích thích hợp vào bình định mức và pha loãng bằng nước (3.1) đến thể tích cần thiết cho phép đo sắc ký [xấp xỉ bằng thể tích của dung dịch chuẩn hiệu chuẩn (3.17)].

Lọc vài mililít dung dịch qua màng lọc cỡ lỗ 0,45 μm (4.5) trước khi bơm vào cột HPLC. Tiến hành chạy sắc ký theo 5.4.

Bảo vệ dung dịch chuẩn và dịch chiết tránh ánh nắng trực tiếp của mặt trời. Nếu không thể phân tích các dịch chiết trong cùng ngày, thì các dịch chiết có thể được bảo quản ở 5 °C tối đa là ba ngày.

5.3 Xác định tryptophan tổng số (dịch thủy phân)

Cân từ 0,1 g đến 1 g mẫu đã chuẩn bị (5.1) chính xác đến 0,2 mg vào bình polypropylen (4.4). Phần mẫu thử đã cân nên có hàm lượng nitơ khoảng 10 mg. Cho 8,4 g bari hydroxit octahydrat (3.4) và 10 ml nước (3.1). Trộn trên máy trộn Vortex (4.8) hoặc máy khuấy từ (4.7). Để nam châm được bọc bằng teflon trong hỗn hợp. Rửa thành bình bằng 4 ml nước (3.1). Vặn nắp xoáy và đậy kín bình. Chuyển sang nồi hấp áp lực (4.6) có chứa nước sôi, và hấp bằng hơi nước trong 30 đến 60 phút. Đậy nồi hấp áp lực và hấp ở $(110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C})$ trong 20 giờ.

Trước khi mở nồi hấp áp lực, giảm nhiệt độ chỉ vừa thấp hơn 100 °C. Để tránh tạo tinh thể $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, thì thêm 30 ml nước (3.1) ở nhiệt độ phòng vào hỗn hợp đang ấm. Lắc hoặc khuấy nhẹ. Thêm 2,00 ml dung dịch nội chuẩn đậm đặc (α -metyltryphtophan) (3.16). Làm nguội bình trong nước hoặc bể đá trong 15 phút.

Sau đó, cho thêm 5 ml axit orthophosphoric (3.14). Giữ bình trong bể làm nguội và trung hòa bằng HCl 6 mol/l (3.11) trong khi vẫn khuấy liên tục và chỉnh pH đến 3,0 bằng cách sử dụng 1 mol/l HCl (3.12). Cho thêm một lượng metanol vừa đủ để có được nồng độ metanol khoảng từ 10 % đến 30 % ở thể tích cuối cùng. Chuyển thể tích thích hợp sang bình định mức và pha loãng bằng nước (3.1) đến thể tích cần thiết cho phép đo sắc ký (ví dụ 100 ml). Việc bổ sung metanol không được tạo kết tủa.

Lọc vài mililít dung dịch qua bộ lọc màng 0,45 μm (4.5) trước khi bơm lên cột HPLC. Tiến hành chạy sắc ký theo 5.4.

$V_{is,sam}$ là thể tích của dung dịch nội chuẩn đậm đặc (3.16) được bổ sung vào dịch chiết (5.2) (= 5,00 ml) hoặc dịch thủy phân (5.3) (= 2,00 ml) tính bằng mililit;

$A_{is,sam}$ là diện tích pic của chất nội chuẩn trong dịch chiết (5.2) hoặc dịch thủy phân (5.3);

$A_{try,cal}$ là diện tích pic của dung dịch chuẩn hiệu chuẩn tryptophan (3.17);

$V_{is,cal}$ là thể tích của dung dịch nội chuẩn đậm đặc (= 2,00 ml) (3.16), được bổ sung vào dung dịch chuẩn hiệu chuẩn (3.17), tính bằng mililit;

m là khối lượng của mẫu, tính bằng gam (được chỉnh về khối lượng ban đầu nếu đã được sấy khô và/ hoặc khử chất béo).

7 Độ chụm

7.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

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

7.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, đơn lẻ, 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 vượt quá giới hạn lặp lại r được nêu trong các bảng từ A.1 đến A.3.

7.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử đơn lẻ, thu được khi sử dụng cùng phương pháp trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R cho trong các bảng từ A.1 đến A.3.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;

- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như mọi sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng thử nghiệm do liên minh Châu Âu tổ chức đã tiến hành phân tích trên ba mẫu phân tích gồm 12 phòng thử nghiệm để kiểm tra xác nhận phương pháp thủy phân. Trên mỗi mẫu thực hiện năm phép phân tích kép. Các kết quả được nêu trong bảng A.1.

Bảng A.1

	Mẫu 1 Thức ăn cho lợn	Mẫu 2 Thức ăn bổ sung cho lợn có L-tryptophan	Mẫu 3 Thức ăn đậm đặc cho lợn
Số lượng các phòng thử nghiệm có kết quả	12	12	12
Số lượng kết quả thử nghiệm từ các phòng thử nghiệm còn lại	50	55	50
Giá trị trung bình $\bar{x}$, g/kg	2,42	3,40	4,22
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , g/kg	0,05	0,05	0,08
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	1,9	1,6	1,9
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$), g/kg	0,14	0,14	0,22
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , g/kg	0,15	0,20	0,09
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	6,3	6,0	2,2
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$), g/kg	0,42	0,56	0,25

Một nghiên cứu cộng tác khác gồm 13 phòng thử nghiệm tham gia phân tích trên hai mẫu để kiểm tra xác nhận phương pháp chiết tryptophan. Trên mỗi mẫu thực hiện năm phép phân tích kép. Các kết quả được nêu trong bảng A.2.

Bảng A.2

	Mẫu 4 Hỗn hợp lúa mì và đậu tương	Mẫu 5 Hỗn hợp lúa mì và đậu tương (= 4 mẫu) có bổ sung tryptophan (0,457 g/kg)
Số lượng phòng thử nghiệm gửi kết quả	12	12
Số lượng kết quả thử nghiệm từ các phòng thử nghiệm còn lại	55	60
Giá trị trung bình $\bar{x}$, g/kg	0,391	0,931
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , g/kg	0,005	0,012
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, %	1,34	1,34
Giới hạn lặp lại, r ($= 2,8 s_r$), g/kg	0,014	0,034
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , g/kg	0,018	0,048
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, %	4,71	5,11
Giới hạn tái lập, R ($= 2,8 s_R$), g/kg	0,05	0,134