

TCVN 9527:2012

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG NHÓM TETRACYCLINE –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG-ÁI LỰC
CHỌN LỌC CHELAT KIM LOẠI**

*Milk – Determination of multiple tetracycline residues –
Metal chelate affinity-liquid chromatographic method*

HÀ NỘI – 2012

Lời nói đầu

TCVN 9527:2012 được xây dựng trên cơ sở AOAC 995.04 *Multiple tetracycline residues in milk. Metal chelate affinity-liquid chromatographic method*;

TCVN 9527:2012 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa – Xác định dư lượng nhóm tetracycline – Phương pháp sắc kí lỏng-ái lực chọn lọc chelat kim loại

*Milk – Determination of multiple tetracycline residues –
Metal chelate affinity-liquid chromatographic method*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí lỏng-ái lực chọn lọc chelat kim loại để xác định tetracycline ở nồng độ 15 ng/ml đến 80 ng/ml; chlortetracycline và oxytetracycline ở nồng độ từ 15 ng/ml đến 60 ng/ml trong sữa bò nguyên liệu.

Tiêu chuẩn này cũng dùng để đánh giá sàng lọc đối với demeclocycline, doxycycline, methacycline và minocycline ở nồng độ ≥ 15 ng/ml.

2 Nguyên tắc

Tetracycline được tách ra khỏi dịch chiết sữa bằng phản ứng tạo phức chelat với các ion đồng liên kết thuận nghịch với nhựa đã hoạt hóa epoxy trong axit iminodioxetic. Phần mẫu thử được loại chất béo, axit hóa và li tâm. Phần dịch nổi trong suốt phía trên được cho vào cột mini chelat hóa đã được nạp các ion đồng. Rửa cột và rửa giải tetracyclin với chất đệm có chứa EDTA.

Dịch rửa giải được siêu lọc để loại bỏ hết protein còn lại và dịch lọc được bơm lên cột sắc kí lỏng. Tetracycline được hấp phụ và làm giàu bằng cách sử dụng 100 % pha động có dung dịch đệm, sau đó được rửa giải bằng pha axetonitril 22 % và metanol 8 %.

3 Thuốc thử

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

CẢNH BÁO: Tetracycline là chất gây dị ứng và có thể gây dị dạng cho thai nhi. Cần phải cẩn thận khi xử lý tetracycline chuẩn.

3.1 Nước, loại dùng cho phân tích sắc kí lỏng, đã loại khoáng và chiếu bằng UV để loại bỏ các vết tạp chất hữu cơ.

3.2 Dung môi metanol và axetonitril, loại dùng cho phân tích sắc kí lỏng.

3.3 Dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl

Lấy 12,9 g axit xitric ngâm một phần từ nước và 10,9 g dinatri hydrophosphat khan cho vào bình định mức 1 lít và pha loãng bằng nước đến vạch. Bảo quản dung dịch đệm McIlvaine này trong tủ lạnh.

Chuẩn bị dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl như sau:

Lấy 37,2 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 29,2 g natri clorua cho vào bình định mức 1 lít và pha loãng bằng dung dịch đệm McIlvaine đến vạch. Dung dịch này chứa EDTA 0,1 M và natri clorua 0,5 M. Lọc dung dịch qua giấy lọc nylon số 66 cỡ lỗ 0,2 μm . Bảo quản dung dịch ở nhiệt độ phòng không quá 2 tuần.

3.4 Chất chuẩn phân tích tetracycline

Các chất chuẩn đối chứng đã được công nhận của: oxytetracycline, muối hydrochlorua của minocycline, tetracycline, demeclocycline, chlortetracycline, methacycline, và doxycycline hyclate¹⁾.

3.4.1 Dung dịch chuẩn gốc tetracycline, 100 $\mu\text{g/ml}$

Lấy 10 mg mỗi loại tetracycline (hiệu chính theo hiệu lực và hàm lượng axit clohydric) cho vào bình sẫm màu hoặc bình định mức 100 ml được bọc bằng lá nhôm. Pha loãng bằng metanol đến vạch. Lắc hỗn hợp để hòa tan. Các dung dịch gốc này có thể bền trong 2 tháng ở nhiệt độ 10 °C.

3.4.2 Dung dịch chuẩn làm việc tetracycline, 1 $\mu\text{g/ml}$

Chuyển 0,5 ml từng dung dịch chuẩn gốc tetracycline (3.4.1) vào từng bình màu hổ phách 50 ml hoặc bình định mức được bọc lá nhôm. Pha loãng bằng metanol đến vạch. Bảo quản dung dịch này không quá 5 ngày ở nhiệt độ 10 °C.

3.4.3 Dung dịch chuẩn tetracycline dùng cho sắc kí

Dung dịch này không bền, do đó nên chuẩn bị dung dịch trong ngày làm việc với các nồng độ sau:

3.4.3.1 Nồng độ 150 ng/ml

Chuyển 0,750 ml dung dịch chuẩn làm việc tetracycline (3.4.2) và bình định mức 5,0 ml. Pha loãng bằng dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3) đến vạch.

¹⁾ Các chất này có bán sẵn từ Công ty US. Pharmacopeia, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD 20857, USA. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

3.4.3.2 Nồng độ 100 ng/ml

Pha loãng 4 ml dung dịch nồng độ 150 ng/ml (3.4.3.1) bằng 2 ml dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3) (tỷ lệ 2 + 1).

3.4.3.3 Nồng độ 50 ng/ml

Pha loãng 2 ml dung dịch nồng độ 100 ng/ml (3.4.3.2) bằng 2 ml dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3) (tỷ lệ 1 + 1).

3.4.3.4 Nồng độ 20 ng/ml

Pha loãng 1 ml dung dịch nồng độ 150 ng/ml (3.4.3.1) bằng 4 ml dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3) (tỷ lệ 1 + 4).

Các dung dịch chuẩn tetracycline dùng cho sắc kí nồng độ 20, 50, 100 và 150 ng/ml tương ứng với các nồng độ 10, 25, 50 và 75 ng/ml trong mẫu sữa chưa pha loãng.

3.5 Nhựa chelat kim loại

Axit iminodiacetic liên kết cộng hóa trị với epoxy hoạt hóa Sepharose 6B Fast Flow ²⁾ trong huyền phù etanol 20 %. Bảo quản dung dịch này trong tủ lạnh.

3.6 Dung dịch đệm natri succinat, nồng độ 0,1 M, pH 4,0

Lấy 11,8 g axit succinic cho vào bình định mức 1 lít và hòa tan trong nước đến gần 1 lít. Chuẩn độ đến pH = 4,0 bằng natri hydroxit 10 M [tỷ lệ: 1 + 1 (thể tích)], sau đó thêm nước đến vạch. Bảo quản dung dịch này trong tủ lạnh. Loại bỏ sau 1 tháng hoặc nếu xuất hiện tạp chất.

3.7 Đồng sulfat (CuSO₄), nồng độ 10 mM.

Hòa tan và pha loãng 0,5 g đồng sulfat ngậm năm phân tử nước bằng nước đến 200 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

3.8 Etanol, 20 % (thể tích).**3.9 Pha động, loại dùng cho sắc kí lỏng.****3.9.1 Dung môi A: axit oxalic 10 mM**

Hòa tan 1,26 g axit oxalic ngậm hai phân tử nước trong 1 lít nước. Dung dịch này bền được 1 tháng.

²⁾ Sản phẩm này của Công ty Amersham Pharmacia Biotech, SE 75184, Uppsala, Thụy Điển, số 17-0578-01, hoặc số 800 Centennial Ave, PO Box 1387, Piscataway, NJ 08855-1387, USA, website: www.apbiotech.com; hoặc Sigma I4510. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

3.9.2 Dung môi B: metanol.

3.9.3 Nước.

3.9.4 Axetonitril.

Lọc tất cả các pha động qua giấy lọc nylon 66 cỡ lỗ 0,2 μm .

Nếu dùng hệ thống bơm hai kênh thì có thể thay dung môi B từ axetonitril-metanol (tỷ lệ: 22 + 8 phần thể tích) thành axit oxalic axetonitril-metanol 10 mM [tỷ lệ: 70 + 22 + 8 (thể tích)] để đáp ứng các yêu cầu thích hợp của hệ thống.

3.10 Metanol.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

4.1 Máy sắc kí lỏng (LC)

Với máy bơm sắc kí lỏng bốn kênh có sự khí dung môi He tự động [có thể sử dụng bơm LC hai kênh để thay đổi các pha động LC và gradient pha động đối với các điều kiện vận hành máy sắc kí lỏng];

Detector UV được cài đặt ở bước sóng 355 nm.

CHÚ THÍCH Cài đặt trên toàn kênh tương ứng với 0,02 đơn vị hấp thụ đến 0,05 đơn vị hấp thụ. Dung dịch tetracycline sắc kí nồng độ 150 ng/ml cần cho độ lệch trên toàn thang đo.

Máy bơm thủ công hoặc máy bơm mẫu tự động được trang bị với vòng bơm 2 ml; và bộ tích phân hoặc máy tính được hỗ trợ bộ phận để thu thập dữ liệu và hệ thống phân tích.

4.2 Cột sắc kí lỏng

Cột PLRP-S, kích thước 150 mm x 4,6 mm, cỡ hạt: 5 μm , 100 Å, có cột bảo vệ chứa cùng chất liệu nhồi³⁾.

4.3 Máy li tâm lạnh

Thực hiện ở 10 °C, có gắn roto góc cố định để giữ các ống nghiệm đường kính 18 mm và roto giữ các ống li tâm dung tích 15 ml dùng một lần.

³⁾ Sản phẩm có bán sẵn từ Phòng thử nghiệm Polymer, Inc., Amherst Fields Research Park, 160 Old Farm Rd, Amherst, MA 01002, USA, Part No. 1S12-1S00. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

4.4 Cột mini ⁴⁾

Cột polypropylen, có bình chứa 10 ml, có xốp ở đáy thủy tinh, được chia vạch đến 0,2 ml phần thấp hơn 2 ml.

4.5 Giá đỡ

Để giữ các cột mini (tùy chọn). Có bán sẵn hoặc được làm từ giá đỡ ống thử nghiệm bằng sợi thép.

4.6 Bình siêu lọc bằng li tâm

Dung tích khoảng 2,5 ml. Dùng để loại bỏ protein có khối lượng phân tử $\geq 30\ 000$ dalton mà không làm giảm đáng kể nồng độ tetracyclin. Ngay trước khi sử dụng, rửa bình siêu lọc bằng cách li tâm 15 min ở gia tốc 1 500g với 2 ml nước. Lắc bình lưu và bình lọc để loại bỏ hết nước.

4.7 Bộ lọc bằng xyranh

Bộ lọc nylon số 66 có cỡ lỗ 0,2 μm . Thay cho thiết bị siêu lọc bằng li tâm (4.6).

4.8 Thiết bị lọc

Thiết bị bằng thủy tinh để lọc dung môi dùng cho sắc ký lỏng với bộ lọc Nylon số 66 cỡ lỗ 0,2 μm .

4.9 Bình định mức, dung tích 1 lít, 100 ml và 5 ml, phù hợp với loại A quy định trong TCVN 7153 (ISO 1042) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*⁴⁾.

4.10 Pipet tự động, có thể điều chỉnh được, dung tích từ 10 μl đến 200 μl và từ 0,05 ml đến 1,00 ml, có độ chính xác $> 98\%$ và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) $< 2\%$.

4.11 Ống li tâm, dung tích 15 ml, được làm bằng polypropylen có nắp vặn.

4.12 Máy trộn Vortex.

5 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

⁴⁾ Sản phẩm có bán sẵn từ Công ty Bio-Rad, 2000 Alfred Nobel Dr, Hercules, CA 94547, USA. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

6 Cách tiến hành

6.1 Sự thích hợp của hệ thống

Kiểm tra sự thích hợp của hệ thống sắc kí lỏng với từng bộ mẫu thử bằng cách chạy các dung dịch chuẩn sắc kí tetracycline sử dụng gradient như trong 6.6.1. Hệ thống sắc kí lỏng phải đáp ứng các tiêu chí sau:

- Không xuất hiện các pic tetracycline trong dải chạy khi không bơm hoặc chỉ bơm chất đệm.
- Xuất hiện pic (tín hiệu/nhiều > 10) khi bơm chlortetracycline nồng độ 10 ng lên cột sắc kí lỏng.
- Độ phân dải đường nền hoặc cận đường nền của tất cả 7 loại tetracycline; độ phân giải giữa oxytetracycline và tetracycline phải > 90 % (chiều cao của điểm lõm giữa 2 pic) và giữa methacycline và doxycycline phải > 70 %.
- Thời gian lưu của dư lượng tetracycline phải ổn định, có thay đổi thời gian < 0,1 min giữa các dung dịch chuẩn sắc kí tetracycline được bơm riêng cho vài lần chạy sắc kí.
- Cần thu được đường chuẩn tuyến tính. Các giá trị tính được đối với các chất hiệu chuẩn phải phù hợp với các giá trị thực trong khoảng 10 %.

6.2 Chuẩn bị các phép kiểm chứng

Để kiểm chứng, sử dụng sữa bò nguyên liệu nguyên chất (tươi hoặc đông lạnh, không có dấu hiệu bị chua hoặc bị vón).

6.2.1 Mẫu kiểm chứng âm tính, sữa không có tetracycline.

6.2.2 Mẫu kiểm chứng dương tính, sữa có bổ sung tetracycline với các nồng độ 15 ng, 30 ng và 60 ng tetracycline/ml tương ứng bằng cách cho thêm dung dịch chuẩn làm việc tetracycline (3.4.2) 75 µl, 150 µl và 300 µl vào các phần dung dịch 5-ml sữa kiểm chứng.

Phân tích các mẫu kiểm chứng âm tính và dương tính ban đầu để làm quen với phương pháp.

Phân tích các mẫu kiểm chứng âm tính và dương tính riêng rẽ trong ngày phân tích để đảm bảo chất lượng của phương pháp.

6.3 Chuẩn bị cột mini

Cột mini có thể được chuẩn bị đồng thời theo các nhóm, có thể chiết được từ 10 đến 14 dung dịch mẫu thử trong 8 h. Chuẩn bị cột mini như sau:

6.3.1 Khuấy chai chứa nhựa chelat kim loại (3.5) để thu được dung dịch huyền phù

6.3.2 Dùng pipet tự động (4.10) có đầu tip 1 ml được cắt bỏ một đoạn ở phần dưới từ 2 mm đến 3 mm bằng dao sắc để tăng kích thước lỗ, để chuyển 2 phần chất lỏng 0.7 ml nhựa chelat kim loại (3.5) vào cột mini (4.4).

6.3.3 Mở đầu ra ở đáy của cột mini và tháo hết dung dịch đệm. Nếu cần, bổ sung hoặc loại bỏ nhựa sao cho thể tích cuối cùng còn lại từ 1,0 ml đến 1,2 ml. Rửa nhựa 3 lần, mỗi lần dùng 2 ml nước và thêm 2 ml dung dịch đồng sulfat (3.7). Rửa lại cột mini 2 lần, mỗi lần dùng 2 ml nước. Thể tích cuối cùng phải từ 1,0 ml đến 1,2 ml với khoảng 0,7 ml dung dịch màu xanh do Cu^{2+} hấp thụ. Một phần ba đáy của cột mini có màu trắng. Cột mini được vận hành sử dụng ống dẫn trọng lực. Cột này có thể được sử dụng không quá 6 lần.

6.4 Chiết

Tiến hành theo các bước sau:

6.4.1 Chuyển $5,0 \pm 0,1$ ml mẫu sữa thử nghiệm (sữa nguyên liệu nguyên chất, tươi hoặc đông lạnh, không có dấu hiệu bị chua hoặc bị vón cục) vào ống li tâm 15 ml (4.11) và li tâm 15 min với gia tốc $1500g$ ở 10°C để tách cream.

6.4.2 Chuyển lớp phía dưới (đã tách chất béo) vào ống li tâm 15 ml (4.11) sạch sử dụng pipet pasteur 9 inch. Cách khác, trong khi vẫn còn lạnh dùng pipet pasteur xuyên qua lớp chất béo rắn và gạn sữa đã tách chất béo qua lỗ. Loại bỏ chất béo. Thêm 10 ml dung dịch đệm natri succinat (3.6) vào sữa đã loại chất béo, đậy nắp, trộn lượng chứa bên trong bằng cách đảo chiều ống vài lần và li tâm 30 min với gia tốc $1500g$ ở 10°C .

6.4.3 Cho dung dịch trong nổi phía trên trực tiếp vào cột mini (6.3). Nếu bình thu nhận không đủ rộng thì cho phần nổi phía trên thành 2 mẻ. Để cho dung dịch chảy qua bộ lọc (4.8). Tránh làm xáo trộn đáy cột. Sau khi không quan sát thấy chất lỏng trên nhựa thì tiến hành bước tiếp theo. Không để cột mini chảy đến khô.

6.4.4 Rửa cột mini liên tiếp theo thứ tự: 2 ml dung dịch đệm natri succinat (3.6), 2 ml nước, 2 ml metanol (3.12) và 2 ml nước.

CHÚ THÍCH 2 bước tiếp theo là cần thiết để có độ thu hồi tốt, chỉ sử dụng dòng trọng lực.

6.4.5 Lấy cẩn thận $0,70 \pm 0,05$ ml dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3) cho lên cột mini. Nhỏ dung dịch đệm quanh thành của cột mà không làm xáo trộn đáy cột. Loại bỏ dịch trong.

6.4.6 Rửa giải tetracycline ra khỏi cột sử dụng thêm $2,5 \pm 0,05$ ml dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3). Thu lấy dung dịch rửa giải (có màu xanh) vào ống nghiệm và bảo quản lạnh cho đến khi

phân tích hoặc thu lấy dung dịch này trực tiếp vào khoang trên của bình siêu lọc bằng li tâm (4.6), và tiến hành siêu lọc như trong 6.5. Ở thời điểm này, cột mini phải có màu trắng.

6.4.7 Làm sạch tiếp cột mini bằng 2 ml đến 3 ml dung dịch đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3). Rửa cột 3 lần mỗi lần dùng 2 ml nước và sau đó dùng 5 ml đến 10 ml etanol (3.8). Phủ nắp cột mini bằng etanol 20 % và bảo quản trong tủ lạnh. Trước khi sử dụng tiếp, trộn lượng chứa trong cột trên máy trộn Vortex (4.12) hoặc đảo chiều cột vài lần để trộn kỹ nhựa chelat kim loại. Khi sử dụng lại cột mini, thì mở nắp cột và bắt đầu từ 6.3.3. Không dùng lại cột đã tiếp xúc với sữa đã bị chua hoặc với sữa có chứa lượng tetracycline quá lớn (lớn hơn 5 µg).

Cột có thể dùng lại được ít nhất 2 tháng nếu được bảo quản hợp lý.

6.5 Siêu lọc

CHÚ THÍCH: Dịch rửa giải thu được trong 6.4.6 không bền và tiếp tục kết tủa có thể bị kín và làm hư hỏng cột sắc kí lỏng. Do đó, cần khử protein của dung dịch thử trước khi phân tích bằng sắc kí lỏng.

Đậy nắp và đảo chiều bình siêu lọc chứa dịch rửa giải (6.4.6) vài lần để đảm bảo dung dịch đồng nhất. Li tâm 30 min đến 90 min ở gia tốc 5000 g trong rotor góc cố định. Dùng máy li tâm, khi dịch lọc ở đáy còn lại ≥ 1 ml.

CHÚ THÍCH Bước này có thể bỏ qua nếu dịch chiết từ 6.4.6 thu được trong ống nghiệm được bảo quản lạnh cho đến khi phân tích sắc kí và sau đó lọc qua bộ lọc bằng xyranh cỡ lỗ 0,2 µm (4.7) ngay trước khi bơm lên cột sắc kí.

6.6 Xác định bằng sắc kí lỏng

Bơm các lượng bằng nhau của 4 dung dịch chuẩn sắc kí tetracycline và các dung dịch thử nghiệm đã lọc lên cột sắc kí lỏng. Kiểm tra độ hấp thụ UV ở bước sóng 355 nm. Tiến hành như sau:

6.6.1 Gradient pha động

Các điều kiện vận hành được quy định trong Bảng 1. Bơm dung dịch thử nghiệm đã lọc với pha động là 100 % dung môi A ở tốc độ dòng 1 ml/min. Sau 1 min thay đổi tuyến tính pha động trên 5 min thành dung môi A-metanol-axetonitril (70 + 8 + 22). Dừng lại thành phần này 11 min ở tốc độ dòng 1 ml/min, trước khi trở về tuyến tính trên 2 min ở tốc độ dòng 1,5 ml/min đối với 100 % dung môi A.

Bảng 1 – Các điều kiện vận hành cột sắc kí lỏng để xác định dư lượng tetracycline trong sữa

Gradient
0 min: Cân bằng 100 % dung môi A ở 1 ml/min. Dung môi A cân bằng chậm. Trong ngày phân tích cân bằng cột sắc kí đã được bảo quản trong dung dịch acetonitrile 50 % trong khoảng 1 h trước khi bắt đầu chạy mẫu. Tiến hành chạy mẫu lần đầu sử dụng dung dịch đệm trắng để loại bỏ pic lạ tạo thành từ việc chạy các dung dịch đệm kéo dài qua cột sắc kí lỏng. Sự cân bằng cột sắc kí lỏng giữa các lần chạy thực hiện trong vài phút.
Từ 0 min đến 1 min: 100 % dung môi A ở 1 ml/min.
Từ 1 min đến 6 min: dung môi A-acetonitrile-methanol (70 + 22 + 8).
Từ 6 min đến 17 min: Dung môi A-acetonitrile-methanol (70 + 22 + 8) ở 1 ml/min. Có thể kéo dài thời gian nếu cần rửa giải tất cả các tetracycline.
Từ 17 min đến 19 min: 100 % dung môi A với độ tuyến tính từ 1 ml/min đến 1,5 ml/min.
Từ 19 min đến 20 min: 100 % dung môi A với độ dốc tuyến tính giảm từ 1,5 ml/min đến 1 ml/min.
Từ 20 min đến 24 min: 100% dung môi A ở 1 ml/min.

Hệ thống bơm hai kênh
Nếu dung môi B chứa axetonitril-metanol (22 + 8, thể tích) thì bắt đầu ở 100 % dung môi A và tăng dần dung môi A lên 70 % và dung môi B 30 % trong 5 min và duy trì trong 11 min.
Nếu dung môi B chứa axit oxalic-axetonitrile-metanol (70 + 22 + 8, thể tích) 10 mM thì bắt đầu ở 100 % dung môi A và tăng dần dung môi B lên 100 % trong 5 min và duy trì trong 11 min.

Cân bằng lại cột sắc kí lỏng trong khoảng ≥ 4 min (để ổn định thời gian lưu) ở điều kiện ban đầu trước khi bơm dung dịch thử tiếp theo.

Các hệ thống không có bộ bơm heli tự động thì có thể gặp phải vấn đề về khử khí, điển hình là sự xuất hiện pic lớn, rộng quanh thời gian rửa giải oxytetracycline. Nếu khó khử khí trong quá trình sắc kí gradient, thì bổ sung các lượng nhỏ axetonitril (từ 2 % đến 5 %) vào dung môi A và tăng thời gian cân bằng giữa các lần chạy mẫu. Điều này có thể cần phải chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc tetracycline (3.4.2) dùng nước thay cho metanol.

Tetracycline không bền trong dung dịch nước, do đó phải chuẩn bị dung dịch chuẩn làm việc tetracycline (3.4.2) trong ngày phân tích.

Bảo quản cột sắc kí lỏng trong dung dịch axetonitril-nước (1 + 1). Trước và sau bảo quản, thổi rửa cột sắc kí và hệ thống sắc kí bằng nước dùng cho sắc kí (khoảng 10 min đến 15 min ở tốc độ dòng 1 ml/min) để ngăn ngừa sự kết tủa của axit oxalic do nồng độ dung môi hữu cơ cao.

6.6.2 Bơm dung dịch thử

Dùng vòng bơm dung tích 2,0 ml, lượng bơm có thể thay đổi, tùy thuộc vào độ nhạy của detector mà có thể bơm khoảng 0,5 ml đến 1,0 ml dung dịch thử đã lọc. Để định lượng chính xác mỗi lần nên bơm các thể tích như nhau. Dùng nước để tráng rửa bộ bơm mẫu tự động để tránh sự kết tủa muối. Cứ sau mỗi lần bơm từ 5 mẫu đến 10 mẫu thì bơm dung dịch chuẩn sắc kí tetracyclin để kiểm tra thời gian lưu.

Trong mỗi ngày thử nghiệm cho chạy từ 1 đến 2 gradient thử trắng trước khi bơm dung dịch chuẩn sắc kí tetracycline (3.4.1) hoặc dung dịch thử để đảm bảo không có chất gây nhiễu nền cạnh thời gian lưu của tetracycline.

6.6.3 Nhận biết pic

Tetracycline rửa giải theo thứ tự sau: minocycline, oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline, chlortetracycline, methacycline và doxycycline.

CHÚ THÍCH Thời gian lưu có xu hướng thay đổi nhẹ theo thời gian sử dụng cột và số lần bơm.

Xác định rõ việc nhận biết pic, vì các tetracycline rửa giải gần như cùng nhau. Tất cả các pic dư lượng yêu cầu cần có thời gian lưu trong khoảng 0,05 min của các thời gian lưu quan sát được từ các chuẩn nằm trong khung.

Một số chất chuyển hóa có thể làm nhiễu phép phân tích các hợp chất gốc khác. Thuốc tetracycline uống cho bò có thể làm xuất hiện cả pic của tetracycline và các pic trước (ví dụ: epitetracycline) mà rửa giải rất gần oxytetracycline.

Đôi khi, có thể xuất hiện pic nội sinh giữa oxytetracycline và tetracycline. Điều này có thể do nồng độ của riboflavin trong sữa cao, thời gian lưu xuất hiện sớm hơn khoảng 0,1 min so với thời gian lưu của tetracycline. Để giảm độ nhiễu của riboflavin, thì trong quy trình chiết dùng thể tích dung dịch đệm natri succinat (3.6) lớn gấp đôi để rửa cột mini (việc này chỉ hơi giảm độ thu hồi của oxytetracycline hoặc tetracycline).

6.6.4 Ổn định dịch chiết

Các tetracycline không bền ở nhiệt độ phòng trong các môi trường axit [nghĩa là trong dung dịch đệm đệm McIlvaine-EDTA-NaCl (3.3)]. Tetracycline và chlortetracycline suy giảm chất lượng $\geq 50\%$ trong vòng 24 h. Các sản phẩm phân hủy có xu hướng rửa giải sớm hơn so với hợp chất gốc và thường dịch chuyển về oxytetracycline. Để tránh điều này, nên tiến hành tất cả các bước li tâm ở 10°C . Làm lạnh dịch chiết hoặc phân tích trong vòng 4 h. Dung dịch rửa giải cột mini có thể được làm lạnh không quá 2 ngày hoặc đông lạnh không quá 1 tuần chỉ hơi làm thay đổi nồng độ tetracycline.

7 Tính kết quả

Chuẩn bị đường chuẩn đối với từng loại tetracycline từ sắc đồ chuẩn.

Tính nồng độ tetracycline sử dụng đường hồi quy tuyến tính sau:

$$y = ax + b$$

Trong đó:

y là nồng độ tetracycline của dịch chiết được bơm, tính bằng ng/ml;

x là diện tích pic hoặc chiều cao pic của tetracycline.

Đường chuẩn của mỗi loại tetracycline phải tuyến tính.

Tính nồng độ tetracycline trong sữa nguyên chất bằng cách chia nồng độ xác định được đối với dung dịch thử được bơm cho 2 (hệ số pha loãng được dùng cho cột mini, để giảm thể tích của phần mẫu thử từ 5 ml xuống 2,5 ml).

Đường nền xác định được bằng hệ thống phân tích dữ liệu tự động cần được kiểm tra đối với từng sắc đồ (xem Phụ lục B về xây dựng đường nền thích hợp).

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 thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy chọn và các chi tiết bất thường khác có ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm

Bảng A.1 và Bảng A.2 đưa ra các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về chấp nhận phương pháp.

Bảng A.1 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về phép xác định nhóm dư lượng tetracycline trong sữa có bổ sung chuẩn, bằng sắc kí lỏng ái lực dùng chelat kim loại^a

Chất kháng sinh	Độ thu hồi trung bình %	Độ lệch chuẩn lặp lại s_r	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD_r , %	Giới hạn lặp lại r	Độ lệch chuẩn tái lập s_R	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD_R , %	Giới hạn tái lập R
Sữa bò có bổ sung ở nồng độ khoảng 15 ng/ml							
Minocycline ^b	69,0	11,4	17	32	16,8	24	47
Oxytetracycline	75,2	9,41	12	26	14,4	19	40
Tetracycline	73,6	9,30	13	26	16,2	22	45
Demeclocycline	71,0	11,6	16	32	11,6	16	32
Chlortetracycline	61,7	15,6	25	44	15,6	25	44
Methacycline	58,9	10,3	18	29	10,6	18	30
Doxycycline	64,9	14,5	22	41	14,5	22	41
Sữa bò có bổ sung ở nồng độ khoảng 30 ng/ml							
Minocycline	69,2	12,4	18	35	16,2	24	45
Oxytetracycline	77,5	6,32	8,2	18	12,1	16	34
Tetracycline	74,8	6,48	8,7	18	15,1	20	42
Demeclocycline	72,3	8,16	11	23	9,13	13	26
Chlortetracycline	64,2	4,72	7,4	13	8,45	13	24
Methacycline	60,3	6,36	11	18	8,53	14	24
Doxycycline	65,2	7,34	11	21	8,66	13	24
Sữa bò có bổ sung ở nồng độ khoảng 60 ng/ml							
Minocycline	72,0	4,11	5,7	12	6,97	9,7	20
Oxytetracycline	78,2	6,75	8,6	19	9,98	13	28
Tetracycline	74,1	6,38	8,6	18	9,68	13	27
Demeclocycline	69,1	6,20	9,0	17	7,79	11	22
Chlortetracycline	63,5	6,25	9,8	18	11,0	17	31
Methacycline	58,6	5,84	10	16	9,48	16	26
Doxycycline	64,8	6,76	10	19	9,25	14	26

^a Mẫu đã biết hàm lượng lặp lại ba lần được các phòng thử nghiệm tham gia chuẩn bị; dựa trên dữ liệu do 8 phòng thử nghiệm cung cấp.

^b Dựa trên dữ liệu từ 7 phòng thử nghiệm.

Bảng A.2 – Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về phép xác định nhóm dư lượng tetracycline trong sữa có bổ sung bằng sắc kí lỏng ái lực dùng chelat kim loại.

Chất kháng sinh	Trung bình ng/ml	Độ lệch chuẩn lặp lại s_r	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại $RSD_r, \%$	Giới hạn lặp lại r	Độ lệch chuẩn tái lặp s_R	Độ lệch chuẩn tương đối tái lặp $RSD_R, \%$	Giới hạn tái lặp R
Minocycline	11,6	2,74	24	7,7	9,25	80	26
Oxytetracycline	18,6	2,50	13	7,0	3,97	21	11
Oxytetracycline	18,8	3,03	16	8,5	6,45	34	18
Oxytetracycline	30,0	4,47	15	13	10,3	34	29
Oxytetracycline (40) ^b	31,4	2,55	8,1	7,1	3,79	12	11
Tetracycline	23,1	3,73	16	10	8,62	37	24
Tetracycline	45,3	3,44	7,6	9,6	13,3	29	37
Tetracycline (80)	54,1	3,94	7,3	11	8,70	16	24
Demeclocycline	37,0	4,39	12	12	5,93	16	17
Chlortetracycline (25)	14,5	1,87	13	5,2	2,94	20	8,2
Chlortetracycline	34,1	4,06	12	11	6,28	18	18
Chlortetracycline	37,4	3,98	11	11	6,02	16	17
Methacycline ^c	38,2	5,51	14	15	7,05	18	20
Doxycycline	30,1	3,60	12	10	6,25	21	18

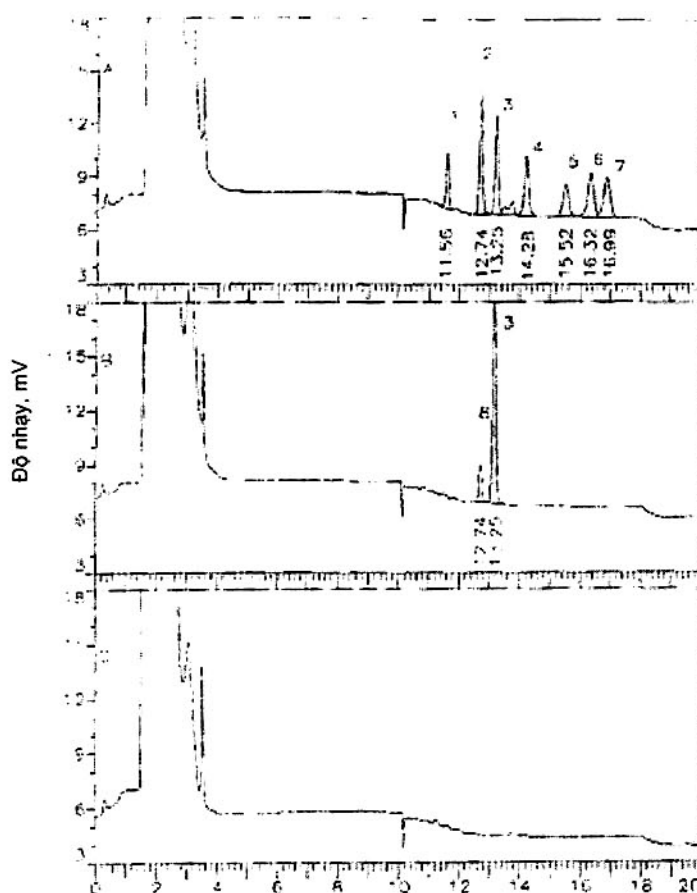
^a Mẫu mù lặp lại hai lần được các phòng thử nghiệm tham gia chuẩn bị; dựa trên dữ liệu do 8 phòng thử nghiệm cung cấp.

^b Số thành trong dấu ngoặc đơn là nồng độ sữa danh định đối với dư lượng tetracycline có bổ sung, tính bằng ng/ml.

^c Dựa trên dữ liệu từ 7 phòng thử nghiệm.

Phụ lục B
(Tham khảo)

Ví dụ về sắc đồ



Hình B.1 – Ví dụ về sắc đồ của mẫu thử

CHÚ DẪN

A Dịch chiết của sữa có bổ sung chất kiểm soát với nồng độ 30 ng của từng tetracycline/ml:

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| 1) minocycline, | 5) chlortetracycline, |
| 2) oxytetracycline, | 6) methacycline |
| 3) tetracycline, | 7) doxycycline. |
| 4) demeclocycline | |

B Dịch chiết của sữa bò được xử lý bằng tetracycline: 8) epitetracycline.

C Dịch chiết của sữa kiểm soát.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] *Simultaneous Determination of Multiple Tetracycline Residues in Milk Using Metal Chelate Affinity Chromatography*, J. AOAC International Vol. **76**, No. 2, 1993, p.329
 - [2] *Simultaneous Determination of Multiple Tetracycline Residues in Milk by Metal Chelate Affinity Chromatography: Collaborative Study*, J. AOAC International Vol. **79**, No. 1, 1996, p. 29-42
-