

Lời nói đầu

TCVN 8543:2010 được chuyển đổi từ 10TCN 836:2006 thành Tiêu chuẩn Quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật;

TCVN 8543:2010 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 – Xác định hàm lượng tylosin bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Animal feeding stuffs – Determination of tylosin content by high performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng kháng sinh tylosin trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Giới hạn định lượng của phương pháp là 1 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 6952:2001 (ISO 6498:1998) *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.*

TCVN 4851 (ISO 3696) *Nước dùng để phân tích trong phòng thử nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Nguyên tắc

Tylosin trong mẫu thức ăn chăn nuôi được chiết bằng metanol. Dịch chiết được làm sạch bằng cột chiết pha rắn (SPE) cyano-propyl và cột nhôm oxit, sau đó tylosin được tách và định lượng trên hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao với detector UV ở bước sóng 280 nm.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước loại 1 theo TCVN 4851 (ISO 3696), trừ khi có quy định khác. Các dung môi phải đạt chất lượng để dùng cho HPLC.

4.1 Axetonitril.

4.2 Dietylamin.

4.3 Hexan.

4.4 Metanol.

4.5 Dung dịch đệm axetat, nồng độ 0,15 M, pH 5,5.

Cân 12,30 g natri axetat vào ống đong 1 000 ml. Thêm 900 ml nước đến khi hòa tan hết. Điều chỉnh pH đến 5,5 bằng dung dịch axit clohydric 1 M và thêm nước đến 1 000 ml.

4.6 Dung dịch đệm phosphat, 0,06 M, pH 8,0

Hòa tan 9,08 g kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) bằng nước vào bình định mức 1 000 ml và thêm nước đến vạch, trộn đều (dung dịch I).

Hòa tan 11,88 g natri hydrophosphat ngậm hai phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) bằng nước vào bình định mức 1 000 ml và thêm nước đến vạch, trộn đều (dung dịch II).

Trộn 5,5 ml dung dịch I và 94,5 ml dung dịch II để được 100 ml dung dịch đệm phosphat 0,06 M, pH 8,0.

4.7 Pha động A

Hòa tan 8,71 g kali hydrophosphat (K_2HPO_4) bằng 900 ml nước. Điều chỉnh pH đến 2,5 bằng dung dịch axit o-phosphoric (H_3PO_4) 85 %. Thêm nước vừa đủ 1 000 ml. Pha động A được chuẩn bị bằng cách trộn dung dịch này với axetonitril theo tỉ lệ thể tích 80 : 20. Sau đó lọc hỗn hợp dung dịch thu được qua phễu hút chân không với màng lọc có kích thước lỗ 0,45 μm , siêu âm đuổi khí ở nhiệt độ thường trong 30 min.

4.8 Dung dịch chuẩn

4.8.1 Dung dịch chuẩn gốc, 1 000 $\mu\text{g/ml}$

Cân 28,25 mg chất chuẩn tylosin, chính xác đến 0,1 mg, vào bình định mức 25 ml (lượng cân được điều chỉnh theo hàm lượng tylosin), hòa tan và định mức bằng metanol.

Các dung dịch chuẩn gốc khi được bảo quản ở 4 °C có thể bền được 1 tháng.

4.8.2 Dung dịch chuẩn làm việc, 10 µg/ml

Lấy 0,1 ml dung dịch chuẩn gốc (4.8.1) vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng metanol, lắc đều để thu được các dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ tương ứng là 10 µg/ml. Pha dung dịch chuẩn làm việc trước khi phân tích mẫu.

4.8.3 Dãy dung dịch chuẩn phân tích sắc kí, 0,625 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml và 5,0 µg/ml

Hút chính xác 5 ml, 2,5 ml, 1,25 ml và 0,625 ml dung dịch chuẩn làm việc 10 µg/ml (4.8.2) cho vào bình định mức dung tích 10 ml, định mức đến vạch bằng metanol để thu được các dung dịch có nồng độ tương ứng là 5,00 µg/ml, 2,50 µg/ml, 1,25 µg/ml và 0,625 µg/ml.

Dung dịch đã pha được bảo quản ở 4 °C, có thể bền được 1 tuần.

4.9 Nhôm oxit, đã hoạt hóa

Hoạt hóa nhôm oxit ở 500 °C trong 12 h, để nguội và bảo quản trong bình hút ẩm.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.2 Cân, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

5.3 Máy li tâm lạnh, có tốc độ 2 000 r/min đến 4 000 r/min.

5.4 Ống li tâm, dung tích 30 ml và 50 ml, bằng polypropylen hoặc bằng thủy tinh, có nắp đậy.

5.5 Máy lắc tròn hoặc máy lắc ngang, có thể đạt tốc độ 250 r/min.

5.6 Máy đo pH, có thể đo chính xác đến 0,05 đơn vị.

5.7 Bình định mức, dung tích 10 ml, 25 ml, 100 ml và 1 000 ml.

5.8 Pipet tự động, có thể điều chỉnh được từ 1 ml đến 10 ml.

5.9 Pipet hút tự động, dung tích 2 ml, 10 ml và 20 ml.

5.10 Micropipet, dung tích từ 10 µl đến 200 µl.

5.11 Ống đong, dung tích 1 000 ml.

5.12 Ống nghiệm, kích thước 10 mm x 100 mm.

- 5.13 **Xyranh**, bằng chất dẻo, dung tích 1 ml.
- 5.14 **Cột chiết pha rắn cyano-propyl**, loại 500 mg/3 ml.
- 5.15 **Bình chiết pha rắn.**
- 5.16 **Bể siêu âm.**
- 5.17 **Bơm hút chân không.**
- 5.18 **Màng lọc**, có kích thước lỗ 0,45 μm .
- 5.19 **Lọ nhỏ dùng cho HPLC**, có nắp vạt PTFE.
- 5.20 **Bộ cô quay chân không**, có nồi cách thủy có thể duy trì nhiệt độ ở 35 °C.
- 5.21 **Thiết bị thổi khí bằng nitơ.**
- 5.22 **Thiết bị trộn mẫu phòng thử nghiệm**, loại Hobart Model C 100 T hoặc tương đương.
- 5.23 **Thiết bị chia mẫu**, loại hình nón hoặc loại nhiều rãnh có hệ thống phân phối.
- 5.24 **Hộp đựng mẫu**, có nắp kín.
- 5.25 **Rây**, có cỡ lỗ 1 mm.
- 5.26 **Hệ thống HPLC gồm có:**
- 5.26.1 **Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao.**
- 5.26.2 **Bình chứa dung môi.**
- 5.26.3 **Hệ thống bơm mẫu.**
- 5.26.4 **Detector UV**, có thể đo ở bước sóng 280 nm.
- 5.26.5 **Bộ tích phân**, hoặc máy tính xử lí dữ liệu.
- 5.26.6 **Cột phân tích HPLC pha đảo**, có kèm **cột bảo vệ**

Chiều dài: 250 mm

Đường kính trong: 4,6 mm

Hạt nhồi: C18, cỡ hạt 5 μm hoặc tương đương

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng cột ngắn hơn, ví dụ có chiều dài 120 mm đến 150 mm.

6 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

6.1 Lấy mẫu

Phương pháp lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này, nên lấy mẫu theo TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu* [1].

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

6.2 Chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952:2001 (ISO 6498:1998).

Nghiền mẫu phòng thử nghiệm (không nhỏ hơn 500 g) để lọt qua rây có cỡ lỗ 1 mm (5.25). Trộn đều mẫu bằng thiết bị trộn mẫu (5.22) trong thời gian 10 min. Sau đó chia hỗn hợp bằng thiết bị chia mẫu (5.23) đến khi thu được lượng mẫu thử không nhỏ hơn 100 g.

Các mẫu thử được bảo quản trong các hộp đựng mẫu (5.24) ở điều kiện nhiệt độ 2 °C đến 25 °C, nơi khô.

LƯU Ý: Nên nghiền, trộn mẫu trong phòng có thông gió, nên đeo kính, khẩu trang và găng tay bảo vệ.

7 Cách tiến hành

7.1 Chiết và làm sạch mẫu thử

7.1.1 Chiết mẫu

Cân từ 1 g đến 5 g mẫu đã được chuẩn bị theo 6.2 (tùy theo hàm lượng kháng sinh có trong mẫu), chính xác đến 0,1 mg, cho vào ống li tâm dung tích 50 ml (5.4), thêm vào 10 ml metanol (4.4). Đậy nắp và lắc ống 15 min trên máy lắc (5.5). Chuyển ống li tâm chứa mẫu vào máy li tâm (5.3), li tâm trong 15 min với tốc độ 4 000 r/min ở 15 °C. Thu lấy dịch trong vào bình cô quay chân không (5.20). Phần cặn trong ống li tâm được chiết tiếp một lần nữa bằng 10 ml metanol như trên, gộp toàn bộ dịch chiết vào bình cô quay.

Cho bay hơi dịch chiết thu được ở trên bằng bộ quay cất chân không (5.20) ở 35 °C đến vừa khô, thêm 200 µl metanol (4.4) và lắc nhẹ bằng tay. Sau đó thêm tiếp 4,8 ml dung dịch đệm axetat (4.5) và lại lắc đều bằng tay. Chuyển toàn bộ dung dịch vào một ống li tâm dung tích 30 ml (5.4). Loại chất béo bằng cách thêm tiếp 5 ml hexan (4.3) vào bình cầu cô quay chân không ở trên, lắc nhẹ bằng tay, sau đó lại chuyển toàn bộ vào ống li tâm nêu trên. Tráng rửa bình cô quay bằng 1 ml dung dịch đệm axetat và tiếp tục chuyển dịch tráng này vào ống li tâm. Lắc mạnh ống li tâm trên máy lắc trong 30 s. Đậy nắp

ống li tâm và tiến hành li tâm ở 15 °C với tốc độ 2 000 r/min trong 5 min. Dùng pipet loại bỏ nhanh lớp hữu cơ, thu lấy lớp axetat (thể tích cuối cùng là 6 ml) để làm sạch.

7.1.2 Làm sạch mẫu

7.1.2.1 Làm sạch bằng cột SPE cyano-propyl

Hoạt hóa cột SPE (5.14) lần lượt bằng 3 ml metanol (4.4) và 5 ml nước.

Cho dung dịch chiết thu được từ 7.1.1 (6 ml), qua xyranh (5.13) vào cột SPE đã hoạt hóa, dùng bơm hút chân không (5.17) và điều chỉnh tốc độ chảy không quá 1 ml/min, lưu ý không để cột bị khô trong giai đoạn này. Tráng ống li tâm và rửa cột bằng 3 ml nước với tốc độ 1 ml/min, sau đó bằng 3 ml metanol (4.4) với tốc độ 1 ml/min.

Hút chân không để làm khô cột SPE trong 1 min. Sau đó rửa giải tylosin bằng 5 ml metanol chứa 1 % diethylamin (4.2) để dịch chảy tự nhiên vào ống nghiệm (5.12). Cho dịch rửa giải bay hơi đến khô, sử dụng thiết bị thổi khí bằng nitơ (5.21) ở nhiệt độ 35 °C. Hoà tan phần mẫu thử bằng 1 ml hỗn hợp dung dịch đệm phosphat pH 8,0 (4.6) : metanol với tỉ lệ 1 : 1 (phần thể tích).

7.1.2.2 Làm sạch bằng cột nhôm oxit

Chuẩn bị cột nhôm oxit như sau: Lót một lớp bông thủy tinh vào xyranh bằng chất dẻo 1 ml (5.13), nhồi nhôm oxit đã hoạt hóa (4.9) đến vạch 0,5 ml, lót lớp trên bằng một ít bông thủy tinh.

Đặt cột nhồi nhôm oxit đã hoạt hóa vào giá và giữ theo hướng thẳng đứng. Chuyển 1 ml dịch làm sạch qua cột SPE (7.1.2.1) qua cột nhôm oxit. Để dịch chảy ra tự nhiên, bỏ 0,1 ml dịch đầu tiên, thu 0,5 ml dịch chảy ra tiếp theo, lọc qua màng lọc có cỡ lỗ 0,45 µm (5.18) vào lọ nhỏ dùng cho HPLC (5.19) để phân tích trên hệ thống sắc kí lỏng (5.26).

7.2 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu thức ăn chăn nuôi được xác định là không có tylosin. Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự như mẫu thử theo 7.1.

7.3 Chuẩn bị mẫu để xác định độ thu hồi

Mẫu để xác định độ thu hồi được bổ sung một lượng tylosin xấp xỉ dung dịch chuẩn gốc.

VÍ DỤ: Chuẩn bị dịch mẫu thu hồi có hàm lượng tylosin 1,25 mg/kg như sau: dùng pipet hút chính xác 0,625 ml dung dịch chuẩn làm việc 10 µg/ml (4.8.2) cho vào 5 g mẫu trắng (7.2). Để yên trong 30 min trước khi tiến hành chiết. Sau đó tiếp tục quá trình chiết mẫu tương tự như đối với mẫu thử theo 7.1.

7.5 Phân tích trên HPLC

7.5.1 Điều kiện sắc kí

Nhiệt độ cột: 30 °C;

Detector UV: 280 nm;

Tốc độ dòng: 0,7 ml/min;

Thể tích bơm: 50 µl;

Pha động A xem 4.7;

Pha động B axetonitril.

Chương trình gradient dung môi như sau:

Thời gian, min	Pha động A, tỉ lệ thể tích	Pha động B, tỉ lệ thể tích
0,01	100	0
0,5	60	40
12,5	60	40
14,5	100	0
20	100	0

CHÚ THÍCH: Các thông số về tỉ lệ pha động, chương trình gradient có thể điều chỉnh tùy thuộc vào điều kiện thực tế của thiết bị HPLC sử dụng.

7.5.2 Phương pháp xác định

7.5.2.1 Nên sử dụng bảo vệ cột, việc sử dụng bảo vệ cột không có bất cứ ảnh hưởng nào đến kết quả phân tích.

7.5.2.2 Cân bằng hệ thống sắc kí bằng pha động 30 min trước khi bơm mẫu.

7.5.2.3 Quy trình bơm mẫu theo thứ tự như sau: dịch mẫu trắng, các dung dịch chuẩn, dịch mẫu thu hồi, dịch mẫu thử, các dung dịch chuẩn.

Cần bơm các dịch chuẩn trước và sau mỗi đợt phân tích, không nên để quá 20 lần bơm mẫu cho mỗi đợt phân tích. Nếu quá 20 lần thì phải bơm các dung dịch chuẩn thêm lần nữa vào khoảng giữa đợt bơm mẫu.

7.5.2.4 Xác định diện tích (hoặc chiều cao) pic đối với các dung dịch chuẩn và dung dịch mẫu thử tương ứng.

7.5.2.5 Sau khi chạy máy phải làm sạch hệ thống HPLC bằng hỗn hợp gồm nước : axetonitril (4.1) theo tỉ lệ thể tích 40 : 60 trong 30 min để loại hết dung dịch đệm trong hệ thống trước khi tắt máy.

8 Tính kết quả

8.1 Dựng đường chuẩn

8.1.1 Phải đảm bảo rằng các diện tích pic của mẫu thử đều không vượt quá diện tích pic của mẫu chuẩn ở nồng độ lớn nhất, trong trường hợp vượt quá thì tiến hành thử nghiệm lại với độ pha loãng phù hợp.

8.1.2 Xây dựng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa diện tích pic thu được của dung dịch chuẩn với nồng độ của tylosin theo quan hệ tuyến tính bậc 1:

$$y = ax + b$$

Trong đó:

y là diện tích pic (hoặc chiều cao pic);

x là nồng độ của tylosin;

a là hệ số góc;

b là hằng số.

8.2 Tính toán

8.2.1 Hàm lượng tylosin có trong mẫu thử, X , tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg), được tính dựa vào đường hồi quy tuyến tính (8.1.2) theo công thức sau:

$$X = \frac{(Y - b)}{a} \times \frac{V}{m}$$

Trong đó:

Y là hiệu số giữa diện tích pic của dịch chiết mẫu thử và diện tích pic của mẫu trắng;

a, b là các thông số của đường chuẩn $y = ax + b$ (xem 8.1.2);

V là thể tích dịch chiết thu được sau khi làm sạch (7.1.2.1), tính bằng mililit (ml);

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

8.2.2 Kết quả cuối cùng là giá trung bình của hai lần phân tích nhắc lại. Giá trị trung bình được làm tròn đến một chữ số thập phân.

8.2.3 Xác định độ thu hồi, R , tính bằng phần trăm (%), theo công thức sau:

$$R = \frac{C_1}{C} \times 100$$

Trong đó:

C_1 là hàm lượng tylosin xác định được theo quy trình phân tích, tính bằng miligam trên kilogam (mg/kg);

C là hàm lượng tylosin được bổ sung vào mẫu (1,25 mg/kg).

Độ thu hồi được xác định cho mỗi lần chạy mẫu phải nằm trong khoảng từ 80 % đến 120 %.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo kết quả phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- phương pháp thử đã dùng, cũng như viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002), *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.*
- [2] Prats. et al (2001). Determination of Tylosin residue in pig tissues using high- performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 766:57- 65
- [3] Civitareale, M. Fiori, A. Ballerini, G. Brambilla (2004). Identification and qualification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36: 317-325