

Lời nói đầu

TCVN 8544:2010 được chuyển đổi từ 10TCN 833:2006 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 8544:2010 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 clotetracyclin, oxytetracyclin và tetracyclin bằng phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

Animal feeding stuffs – Determination of chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline contents by high-performance liquid chromatographic method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng các kháng sinh clotetracyclin (CTC), oxytetracyclin (OTC) và tetracyclin (TC) trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Giới hạn định lượng của phương pháp là 0,3 mg/kg.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây 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 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

Các kháng sinh nhóm tetracyclin trong mẫu thức ăn chăn nuôi được chiết bằng dung dịch đệm ở pH 4,0. Dịch chiết được làm sạch bằng cột chiết pha rắn C18. Các tetracyclin được tách và định lượng trên hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao với detector UV ở bước sóng 350 nm.

4 Thuốc 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 Metanol.

4.2 Axetonitril.

4.3 Dung dịch đệm McIlvaine, pH $4,0 \pm 0,05$

Dung dịch A: Cân 28,4 g natri hydrophosphat (Na_2HPO_4) khan cho vào bình định mức một vạch 1 000 ml, hoà tan và định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.

Dung dịch B: Cân 21,0 g axit xitric ngậm một phân tử nước ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) cho vào bình định mức dung tích 1 000 ml, hoà tan và định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.

Lấy 625 ml dung dịch A và 1 000 ml dung dịch B cho vào bình định mức 2 000 ml, lắc đều. Sử dụng máy đo pH điều chỉnh pH của dung dịch trong bình đến pH $4,0 \pm 0,05$ bằng cách thêm từng giọt dung dịch axit clohydric (HCl) 0,1 M hoặc dung dịch natri hydroxit (NaOH) 0,1 M. Dung dịch đã pha bền trong một tuần.

4.4 Dung dịch đệm McIlvaine - EDTA

Hoà tan 60,5 g dinatri etylen diamin tetraaxetat ngậm hai phân tử nước ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) vào 1 625 ml dung dịch đệm McIlvaine (4.3), lắc đến tan hết và trộn đều. Dung dịch đã pha bền trong một tuần.

4.5 Dung dịch axit oxalic trong metanol

Hòa tan 1,26 g axit oxalic ngậm hai phân tử nước ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) trong bình định mức một vạch 1 000 ml và định mức đến vạch bằng metanol, lắc đều. Dung dịch đã pha chỉ sử dụng trong ngày.

4.6 Dung dịch kháng sinh chuẩn

LƯU Ý: Việc chuẩn bị các dung dịch chuẩn phải được tiến hành tránh ánh sáng trực tiếp và bảo quản trong lọ sẫm màu.

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

Cân 108 mg mỗi chất chuẩn kháng sinh nhóm tetracyclin, gồm clotetracyclin hydroclorit (CTC), oxytetracyclin hydroclorit (OTC) và tetracyclin hydroclorit (TC), loại tinh khiết có kèm theo giấy chứng nhận về hàm lượng, chính xác đến 0,1 mg, cho vào 3 bình định mức một vạch riêng biệt dung tích

100 ml (lượng cân được điều chỉnh theo hàm lượng kháng sinh). Hoà tan và định mức đến vạch bằng metanol, lắc đều.

Các dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở -20°C , có thể bền được 3 tháng.

4.6.2 Hỗn hợp dung dịch chuẩn gốc, 100 $\mu\text{g/ml}$

Lấy chính xác 10 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.1) cho vào bình định mức một vạch 100 ml, định mức đến vạch bằng metanol, lắc đều.

4.6.3 Hỗn hợp dung dịch chuẩn làm việc, 25 $\mu\text{g/ml}$

Lấy chính xác 2,5 ml dung dịch chuẩn hỗn hợp 100 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.2) cho vào bình định mức một vạch 10 ml, định mức đến vạch bằng metanol, lắc đều.

Hỗn hợp dung dịch chuẩn làm việc được bảo quản ở 0°C đến 5°C , có thể bền được 1 tuần.

4.6.4 Dãy dung dịch chuẩn phân tích sắc kí, 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,50 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 2,50 $\mu\text{g/ml}$ và 5,00 $\mu\text{g/ml}$

Lấy chính xác 100 μl , 200 μl , 500 μl , 1 000 μl , 2 000 μl dung dịch chuẩn làm việc 25 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.3) của hỗn hợp các tetracyclin cho vào bình định mức dung tích 10 ml. Thêm 6 ml dung dịch axit oxalic trong metanol (4.5) và định mức đến vạch bằng nước, lắc đều.

Dung dịch đã pha được bảo quản ở 0°C đến 5°C , có thể bền được 1 tuần.

4.7 Pha động cho HPLC

Hòa tan 1,26 g axit oxalic ngậm hai phân tử nước trong bình định mức một vạch 1 000 ml và định mức đến vạch bằng nước, lắc đều. Trộn 600 ml dung dịch axit oxalic này với 300 ml axetonitril và 100 ml metanol, lắc đều, lọc hỗn hợp dung dịch thu được qua màng lọc 0,45 μm sau đó siêu âm đuổi khí ở nhiệt độ phòng trong 30 min. Dung dịch đã pha chỉ sử dụng trong ngày.

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 3 000 r/min.

5.4 **Ống li tâm**, dung tích 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 **Rây**, có cỡ lỗ 1 mm.
- 5.8 **Bình định mức**, dung tích 10 ml, 100 ml, 500 ml, 1 000 ml và 2 000 ml.
- 5.9 **Pipet tự động**, có thể điều chỉnh được từ 2 μ l đến 10 μ l.
- 5.10 **Micropipet**, dung tích từ 10 μ l đến 100 μ l.
- 5.11 **Pipet tự động**, 2 ml, 10 ml và 20 ml.
- 5.12 **Bể siêu âm**.
- 5.13 **Bơm hút chân không**.
- 5.14 **Cột chiết pha rắn (SPE)**, C18 loại 500 mg/6 ml.
- 5.15 **Màng lọc**, có cỡ lỗ 0,45 μ m.
- 5.16 **Lọ nhỏ dùng cho HPLC**, có nắp vận PTFE.
- 5.17 **Bình nón**, dung tích 125 ml, có nắp bằng thủy tinh.
- 5.18 **Thiết bị trộn mẫu phòng thử nghiệm**, loại Hobart Model C 100 T hoặc tương đương.
- 5.19 **Thiết bị chia mẫu**, loại hình nón hoặc loại nhiều rãnh có hệ thống phân phối.
- 5.20 **Hộp đựng mẫu**, có nắp kín.
- 5.21 **Giấy lọc**, Whatman No.41 (15 cm) hoặc loại tương đương.
- 5.22 **Hệ thống HPLC**, gồm có:
- 5.22.1 **Máy sắc kí lỏng hiệu năng cao**.
- 5.22.2 **Bình chứa dung môi**.
- 5.22.3 **Hệ thống bơm mẫu**.
- 5.22.4 **Detector UV**, có thể đo ở bước sóng 350 nm.
- 5.22.5 **Bộ tích phân**, hoặc máy tính xử lí dữ liệu.

5.22.6 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 từ 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 (5.7). Trộn đều mẫu bằng thiết bị trộn mẫu (5.18) trong thời gian 10 min. Sau đó chia hỗn hợp bằng thiết bị chia đôi hoặc thiết bị chia mẫu (5.19) đến khi thu được lượng mẫu thử không nhỏ hơn 100 g.

Các mẫu thử được bảo quản trong các hộp đựng mẫu (5.20) ở điều kiện nhiệt độ từ 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

7.1.1.1 Cân từ 1 g đến 5 g mẫu thử đã được chuẩn bị theo 6.2 (tùy theo hàm lượng kháng sinh có trong mẫu), chính xác đến 0,1 mg, cho vào bình nón dung tích 125 ml (5.17), thêm tiếp 20 ml dung dịch đệm McIlvaine - EDTA (4.4) và đậy nắp, lắc mạnh trên máy lắc (5.5) trong thời gian 30 min. Gạn phần dịch chiết chuyển sang ống li tâm (5.4), đậy nắp và tiến hành li tâm với tốc độ 3 000 r/min ở 4 °C trong 15 min. Gạn phần dịch trong cho vào một bình nón thứ hai. Phần cặn còn lại trong bình nón ban đầu

được chiết tiếp hai lần, mỗi lần dùng 5 ml dung dịch đệm McIlvaine - EDTA (4.4), li tâm và gộp các phần dịch chiết vào bình nón thứ hai.

7.1.1.2 Lọc dịch chiết thu được ở bình nón thứ hai qua giấy lọc Whatman No.41 (5.21) vào bình nón khác. Chú ý làm ẩm giấy lọc bằng dung dịch đệm McIlvaine - EDTA trước khi lọc. Tráng bình nón thứ hai bằng 2 ml dung dịch đệm McIlvaine - EDTA, lặp lại hai lần và chuyển tất cả qua giấy lọc vào bình nón chứa dịch lọc ở trên.

7.1.2 Làm sạch

7.1.2.1 Hoạt hóa cột SPE (5.14) bằng 20 ml metanol (4.1), sau đó bằng 20 ml nước, loại bỏ dịch qua cột.

7.1.2.2 Cho các dịch chiết trong bình nón thu được từ 7.1.1.2 vào cột SPE đã được chuẩn bị ở trên, dùng bơm hút chân không (5.13) và điều chỉnh tốc độ chảy không quá 2 ml/min. Tráng bình nón bằng 15 ml dung dịch đệm McIlvaine - EDTA (4.4) và chuyển hết vào cột SPE, lưu ý không để cột bị khô trong giai đoạn này, rửa cột bằng 20 ml nước và tiếp tục hút chân không để làm khô cột thêm 2 min.

7.1.2.3 Rửa giải các kháng sinh trong cột SPE C18 bằng cách cho 6 ml dung dịch axit oxalic trong metanol (4.5) chảy qua cột với tốc độ 1,5 ml/min. Thu dịch rửa giải vào bình định mức 10 ml. Sau khi dịch rửa giải chảy hết, tiếp tục hút chân không thêm khoảng 10 s để đảm bảo thu hết được dịch rửa giải. Định mức dịch thu được đến vạch bằng nước, lắc đều, sau đó lọc qua màng lọc có cỡ lỗ 0,45 μm (5.15) vào lọ nhỏ dùng cho HPLC (5.16) để phân tích trên hệ thống sắc kí.

7.2 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu thức ăn chăn nuôi được xác định là không có kháng sinh nhóm tetracyclin. Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự như đối với 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 kháng sinh xấp xỉ dung dịch chuẩn gốc.

VÍ DỤ: Chuẩn bị dịch mẫu thu hồi có hàm lượng kháng sinh 1 mg/kg như sau: dùng pipet hút 200 μl dung dịch chuẩn làm việc 25 $\mu\text{g/ml}$ (4.6.3) cho vào 5 g mẫu trắng (7.2), tiếp tục quá trình chiết mẫu tương tự như đối với mẫu thử theo 7.1.

7.5 Tiến hành trên HPLC

7.5.1 Điều kiện sắc kí

Cột sắc kí: theo 5.22.6;

Pha động: theo 4.7;

Tốc độ dòng: 1 ml/min;
Nhiệt độ cột: 30 °C;
Detector UV: bước sóng 350 nm;
Thể tích bơm: 50 µl.

7.5.2 Phương pháp xác định

7.5.2.1 Nên sử dụng cột bảo vệ, 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 (4.7) 30 min trước khi bơm mẫu.

7.5.2.3 Quy trình bơm mẫu theo thứ tự như sau:

- dịch mẫu trắng;
- dung dịch chuẩn làm việc;
- dịch mẫu thu hồi;
- dịch mẫu thử;
- dung dịch chuẩn làm việc.

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 (4.2) : metanol (4.1) theo tỉ lệ 7 : 2 : 1 (phần thể tích) trong 30 min.

8 Tính kết quả

8.1 Dạng 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 từng loại kháng sinh theo quan hệ tuyến tính bậc 1:

$$y = ax + b$$

Trong đó:

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

x là nồng độ của từng loại kháng sinh;

a là hệ số góc;

b là hằng số.

8.2 Tính toán

8.2.1 Hàm lượng các kháng sinh có trong mẫu thử, X , tính bằng miligam trên kilogram (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 (7.1.2.3), tính bằng millilit (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 lặp 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 từng tetracyclin xác định được theo quy trình phân tích, tính bằng miligam trên kilogram (mg/kg);

C là hàm lượng của từng tetracyclin được bổ sung vào mẫu (1 mg/kg).

Độ thu hồi được xác định cho mỗi lần chạy mẫu phải nằm trong khoảng từ 80 % đến 110 %.

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 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] AOAC 995.09 (1997) *Chlortetracycline, Oxytetracycline, and Tetracycline in edible animal tissues*
- [3] Matinez EE, Shimoda W, 1988. Liquid chromatographic determination of Tetracyclin residues in animal feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, May - Jun; 71 (3): 477-80