

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 8545 : 2010

THỨC ĂN CHĂN NUÔI – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG MONENSIN, NARASIN VÀ SALINOMYCIN –
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG VỚI DẪN XUẤT SAU CỘT

Animal feeding stuffs – Determination of monensin, narasin and salinomycin contents – Liquid chromatographic method using post-column derivatization

Lời nói đầu

TCVN 8545:2010 hoàn toàn tương đương với ISO 14183:2005;

TCVN 8545:2010 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 MONENSIN, NARASIN VÀ SALINOMYCIN
– PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG VỚI DẪN XUẤT SAU CỘT

*Animal feeding stuffs – Determination of monensin, narasin and salinomycin contents –
Liquid chromatographic method using post-column derivatization*

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) để xác định hàm lượng monensin, narasin và salinomycin trong thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu bổ sung (dạng khô và lỏng) và các premix khoáng. Phương pháp này không áp dụng đối với các premix thuốc (được phẩm). Phương pháp này không áp dụng để xác định lasalocid và semduramicin.

Giới hạn định lượng đối với monensin, narasin và salinomycin tương ứng khoảng 1mg/kg, 2mg/kg và 2 mg/kg. Giới hạn định lượng thấp hơn cũng có thể đạt được nhưng phải được thẩm định bởi người sử dụng.

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.*

3. Nguyên tắc

Các thể mang ion (ionophore) monensin, narasin và salinomycin được chiết với hỗn hợp metanol/nước (90 + 10) bằng máy lắc trong 1 h, sau đó dịch chiết được lọc. Các thể mang ion được xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo sử dụng dẫn xuất sau cột với vanilin và phát hiện ở bước sóng 520 nm. Các mẫu dương tính nghi ngờ ở mức vết và các mẫu thức ăn chăn nuôi bổ sung thuốc thú y có chứa các thể mang ion không dự kiến được khẳng định bằng cách chiết với hexan hoặc tạo dẫn xuất sau cột với dimethylaminobenzaldehyt (DMAB).

4. Thuốc thử

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

4.1. Nước, loại dùng cho HPLC hoặc tương đương (ví dụ nước siêu sạch Milli-Q).

4.2. Metanol (CH₃OH), loại dùng cho HPLC.

4.3. Axit sulfuric (H₂SO₄), 97 % đến 98 %.

4.4. Axit axetic (CH₃COOH) **bằng**, 97 % đến 98 %.

4.5. Natri hydrocacbonat (NaHCO₃), độ tinh khiết tối thiểu 99 %.

4.6. Vanilin (4-hydroxy-3-metoxymethylbenzaldehyd), độ tinh khiết tối thiểu 99 %.

4.7. Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB), độ tinh khiết tối thiểu 99 %

4.8. Hexan $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3]$, được cất bằng dụng cụ thủy tinh.

4.9. Dung môi chiết, metanol/nước (90 + 10).

Trộn 1 800 ml metanol (4.2) và 200 ml nước (4.1) trong bình 2 lít, trộn đều.

4.10. Pha động

4.10.1. Hệ thống phản ứng sau cột

Vừa khuấy và thêm từ từ bằng pipet 20 ml axit sulfuric (4.3) vào 950 ml metanol (4.2). Để nguội, vừa khuấy vừa thêm 30 g vanilin (4.6). Bảo quản tránh ánh sáng. Chuẩn bị mới trong ngày sử dụng.

4.10.2. Cột HPLC

Hỗn hợp metanol (4.2)/nước (4.1)/axit axetic (4.4) (940 : 60 : 1). Lọc bằng chân không với hệ thống nêu trong 5.7.

4.11. Metanol trung tính

Thêm 1,0 g natri hydrocacbonat (4.5) vào 4 lít metanol (4.2). Trộn đều và lọc qua giấy lọc 11 m, nếu cần (ví dụ giấy lọc Whatman No.1)¹. Xem Chú thích ở 4.13.

4.12. Chất chuẩn

Thành phần hoặc nồng độ của từng lô chất chuẩn cần được biết.

4.12.1. Natri monensin²

4.12.2. Narasin²

4.12.3. Natri salinomycin³

CẢNH BÁO: Tránh bị hít vào hoặc tiếp xúc với các chất chuẩn và dung dịch chuẩn có độc tính. Luôn làm việc trong tủ hút khói khi xử lý các loại dung môi và dung dịch thuốc thử. Mang kính an toàn và quần áo bảo hộ.

4.13. Các dung dịch chuẩn gốc ionophore, khoảng 0,50 mg/ml.

Cân 25 mg mỗi loại chất chuẩn (từ 4.12.1 đến 4.12.3), chính xác đến 0,1 mg, vào các bình định mức 50 ml. Hòa tan bằng metanol trung tính (4.11) và định mức đến vạch. Chuẩn bị mới dung dịch chuẩn gốc hàng tháng. Bảo quản trong tủ lạnh.

Bảo quản các dung dịch chuẩn tránh sáng hoặc chuẩn bị trong các bình thủy tinh sẫm màu.

CHÚ THÍCH: Việc sử dụng metanol trung tính chưa được xác nhận đối với salinomycin. Nếu chỉ phân tích riêng monensin thì không yêu cầu, nhưng là bắt buộc nếu phân tích narasin.

4.13.1. Dung dịch chuẩn gốc monensin

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc monensin theo 4.13. Tính nồng độ dung dịch chuẩn gốc dựa vào thành phần chính monensin A. Thành phần phụ monensin B trong mẫu thử, được rửa giải ngay trước khi rửa giải monensin A^[4], được xác định dựa vào monensin A. Sử dụng thành phần đã nhận biết của chuẩn dựa theo chứng chỉ kèm theo và tính theo công thức:

¹ Đây là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này còn ISO không ấn định phải sử dụng chúng

² Có sẵn tại Lilly Research Laboratories, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, USA

³ Có sẵn tại Alpharma Inc., Animal Health Division, 1 Duggar Drive, Willow Island, WV, USA 26134-97111 và Hoechst Roussel Vet, D-65926 Frankfurt am Main, Gebaude H 790, Germany

$$p_M = \frac{0,5 \cdot S_M}{100}$$

Trong đó:

0,5 là nồng độ của dung dịch chuẩn gốc (4.13), tính bằng miligam trên mililít (mg/ml), được xác định đến ba chữ số có nghĩa;

p_M là nồng độ của monensin A trong dung dịch chuẩn gốc, tính bằng miligam trên mililít (mg/ml);

S_M là tỉ lệ của monensin A trong chất chuẩn đối chứng nêu trong chứng chỉ kèm theo, tính bằng phần trăm (%).

VÍ DỤ Lô chất chuẩn RS0234 chứa 93,71 % monensin A, tính theo khối lượng.

4.13.2. Dung dịch chuẩn gốc salinomycin

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc theo 4.13. Tính nồng độ chuẩn gốc dựa vào nồng độ của chuẩn đối chứng của nhà cung cấp đưa ra ^[2]:

$$p_S = \frac{0,5 \cdot w}{1000}$$

Trong đó:

p_S là nồng độ của salinomycin trong dung dịch chuẩn gốc, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml);

w là hàm lượng của chất chuẩn salinomycin do nhà cung cấp đưa ra, tính bằng microgam trên miligam (g / mg).

VÍ DỤ Đối với lô WS-19B, hàm lượng chất chuẩn là 986 g/mg

4.13.3. Dung dịch chuẩn gốc narasin

Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc theo 4.13. Tính nồng độ chuẩn gốc dựa vào thành phần chính là narasin A. Những thành phần phụ (narasin D và I), được rửa giải sau narasin A ^[5], được xác định dựa vào chuẩn narasin A. Sử dụng thành phần của chuẩn đã biết dựa vào chứng chỉ kèm theo và tính theo công thức.

$$p_N = \frac{0,5 \cdot S_N}{100}$$

Trong đó:

p_N là nồng độ của narasin A trong dung dịch chuẩn gốc, tính bằng miligam trên mililít (mg/ml);

S_N là tỉ lệ của narasin A trong chất chuẩn đối chứng nêu trong chứng chỉ kèm theo, tính bằng phần trăm (%).

VÍ DỤ Đối với lô chất chuẩn RS0234, tỷ lệ phần trăm mỗi thành phần tính theo khối lượng là:

Narasin A = 85,4 %

Narasin D = 1,9 %

Narasin I = 0,7 %

4.14. Dung dịch hỗn hợp chuẩn trung gian, chứa monensin, salinomycin và narasin tương ứng khoảng 20 g/ml, 40 g/ml và 40 g/ml .

Dùng pipet lấy 10,0 ml, 20,0 ml và 20,0 ml các dung dịch chuẩn gốc monensin, salinomycin và narasin (4.13) tương ứng cho vào bình định mức 250 ml. Pha loãng đến vạch bằng dung môi chiết (4.9). Trộn đều. Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong tháng.

4.15. Dung dịch hỗn hợp chuẩn cho HPLC

Chuẩn bị một dãy gồm 5 dung dịch hỗn hợp chuẩn HPLC bằng cách dùng pipet lấy các thể tích hỗn hợp chuẩn trung gian (4.14) vào bình định mức sẫm màu dung tích 100 ml và pha loãng đến vạch bằng dung môi chiết (4.9), như quy định trong Bảng 1. Trộn đều. Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong tháng.

Bảng 1

Kí hiệu hỗn hợp chuẩn HPLC	Thể tích hỗn hợp chuẩn trung gian (4.14) ml	Nồng độ chuẩn cho HPLC g/ml		
		Monensin	Salinomycin	Narasin
A	1	0,2	0,4	0,4
B	5	1	2	2
C	10	2	4	4
D	25	5	10	10
E	50	10	20	20

4.16. Các chuẩn riêng rẽ dùng cho HPLC

4.16.1. Monensin, khoảng 5 g/ml.

Dùng pipet lấy chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc monensin (4.13.1) vào bình định mức 100ml sẫm màu. Pha loãng đến vạch bằng dung môi chiết (4.9). Trộn đều. Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong tháng. Bảo quản trong tủ lạnh.

4.16.2. Salinomycin, khoảng 10 g/ml.

Dùng pipet lấy chính xác 2,0 ml dung dịch chuẩn gốc salinomycin (4.13.2) vào bình định mức 100ml sẫm màu. Pha loãng đến vạch bằng dung môi chiết (4.9). Trộn đều. Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong tháng. Bảo quản trong tủ lạnh.

4.16.3. Narasin, khoảng 10 g/ml

Dùng pipet lấy chính xác 2,0 ml dung dịch chuẩn gốc narasin (4.13.3) vào bình định mức 100 ml sẫm màu. Pha loãng đến vạch bằng dung môi chiết (4.9). Trộn đều. Chuẩn bị dung dịch để sử dụng trong tháng. Bảo quản trong tủ lạnh.

5. Thiết bị, dụng cụ

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

5.1. Hệ thống HPLC, bao gồm các bộ phận sau:

5.1.1. Bơm, đã khử xung, tốc độ dòng từ 0,1ml/min đến 2,0 ml/min.

5.1.2. Bộ phận bơm mẫu, bằng tay hoặc tự động, có khả năng bơm 100 μ l mẫu.

5.1.3. Detector UV/VIS, có bước sóng thay đổi, có thể đo ở bước sóng 520 nm và 592 nm.

5.1.4. Bộ tích phân, hoặc máy tính xử lý dữ liệu.

5.1.5. Bộ phận phản ứng sau cột, với cuộn dây phản ứng dung tích từ 1,5 ml đến 2,0 ml, có thể gia nhiệt ở 98 °C.

Cuộn dây phản ứng có thể mua sẵn hoặc làm bằng ống loại 316 SS, đường kính trong 0,5 mm, chiều dài từ 7,5 m đến 10 m, cuộn lại cho vừa với buồng gia nhiệt. Ví dụ, có thể cuộn ống phản ứng trong giấy nhôm để vừa khít vào bộ phận gia nhiệt và truyền nhiệt tốt. Loại cuộn dây chế tạo sẵn thường được ưa dùng. Để đảm bảo các loại thuốc thử trộn lẫn tốt với nhau, sử dụng máy lắc

trộn hoặc đầu nổi trộn tĩnh (không phải dạng nổi trộn thông thường) phía trước cuộn dây phản ứng.

5.1.6. Bơm thuốc thử sau cột, đã khử xung, với tốc độ từ 0,5ml/min đến 2,0 ml/min.

5.1.7. Cột phân tích.

CHÚ THÍCH: Các loại cột C18 5 m, Nucleosil 120A 25 x 0,46 cm, Partisil 5 ODS-3 hoặc Waters Nova Pak (4 m) hoặc tương đương đã được đánh giá là phù hợp⁴.

5.1.8. Cột bảo vệ, C18.

5.2. Thiết bị thổi khí bằng nitơ, dùng để thổi dung môi sử dụng dòng khí nitơ.

5.3. Máy lắc, dạng tròn hoặc dạng xoắn.

5.4. Cân: Cân phân tích có thể cân 10 g hoặc lớn hơn với độ chính xác 0,1 mg và cân có thể cân 100 g hoặc lớn hơn với độ chính xác 0,01 g.

5.5. Bình nón, dung tích 125 ml, 250 ml và 500 ml, có nắp bằng thủy tinh.

5.6. Giấy lọc, Whatman No. 41 (15 cm), Whatman No. 42 (15 cm) và Whatman No. 1 (15 cm) hoặc tương đương⁴.

5.7. Bộ lọc dung môi, hoàn toàn bằng thủy tinh, dùng cho màng lọc 47 mm và màng lọc nylon 47 mm, cỡ lỗ 0,45 m

5.8. Bộ lọc mẫu, thiết bị dùng màng lọc nylon hoặc PTFE có cỡ lỗ 0,45 m

5.9. Rây, cỡ lỗ lỗ 1 mm.

6. Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497).

7. Chuẩn bị mẫu thử

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

Nghiền mẫu phòng thử nghiệm (> 200 g) để lọt qua rây có cỡ lỗ 1 mm. Đối với các mẫu có lượng vết thì nghiền toàn bộ mẫu thử. Trộn kĩ.

8. Cách tiến hành

8.1. Chuẩn bị mẫu kiểm soát chất lượng

Nên sử dụng các mẫu kiểm soát chất lượng và các biểu đồ kiểm soát chất lượng.

Với mỗi dãy, thêm một mẫu bổ sung chuẩn có hàm lượng monensin, salinomycin và narasin tương ứng khoảng 100 mg/kg, 50 mg/kg và 50 mg/kg (đối với mẫu bổ sung thuốc thú y) hoặc với 4 mg/kg, 6 mg/kg và 6 mg/kg (đối với mẫu có dạng vết).

VÍ DỤ 1 Thêm 4,0 ml chuẩn gốc monensin vào 20 g mẫu để có mẫu bổ sung chuẩn 100 mg/kg và thêm 2,0 ml mỗi dung dịch chuẩn gốc salinomycin và narasin vào 20 g mẫu bổ sung chuẩn 50mg/kg mỗi loại. Tất cả dung dịch gốc có nồng độ xấp xỉ như nhau (0,50 mg/ml, xem 4.13).

VÍ DỤ 2: Thêm 3,0 ml dung dịch hỗn hợp chuẩn trung gian (4.14) vào 20 g mẫu để có mẫu bổ sung chuẩn 3 mg/kg đối với monensin và 6 mg/kg đối với salinomycin và narasin.

Độ thu hồi đối với mẫu bổ sung thuốc thú y (> 10 mg/kg) phải nằm trong khoảng từ 95 % đến 108%. Độ thu hồi đối với mẫu dạng vết (< 10 mg/kg) phải nằm trong khoảng từ 90 % đến 110 %.

⁴ Đây là các ví dụ về các sản phẩm thích hợp có sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này còn ISO không ấn định phải sử dụng chúng

8.2. Chiết mẫu

8.2.1. Mẫu thức ăn chăn nuôi khô và các premix chứa < 5000 mg/kg

Cân chính xác 20 g mẫu thử vào bình nón 250 ml. Đối với các premix khoáng, thêm 5 g natri hydrocacbonat. Thêm 100 ml dung môi chiết (4.9). Đậy nắp và lắc mạnh trong 1 h bằng máy lắc (5.3).

8.2.2. Mẫu thức ăn chăn nuôi khô và các premix chứa > 5000 mg/kg

Cân chính xác 5 g mẫu vào bình nón 500 ml. Đối với mẫu premix khoáng, thêm 2 g natri hydrocacbonat. Thêm 200 ml dung môi chiết (4.9). Đậy nắp và lắc mạnh trong 1 h bằng máy lắc (5.3).

8.2.3. Mẫu dạng lỏng

Đồng hóa mẫu bằng cách khuấy mẫu trên máy khuấy từ hoặc máy khuấy trộn. Lấy 20 ml mẫu dạng lỏng cho vào một ống đong chia độ 25 ml đã biết khối lượng. Cân và chuyển mẫu vào bình nón 500 ml. Thêm 180 ml metanol (4.2) (dùng một ít để tráng ống đong). Đậy nắp bình nón và lắc mạnh trong 1 h bằng máy lắc (5.3).

8.2.4. Lọc dịch chiết

Lọc dịch chiết qua giấy lọc Whatman No.41 (5.6) vào một bình nón 125 ml.

Đối với dịch chiết có nồng độ kháng sinh ionophore cao, pha loãng đến nồng độ tương đương với chuẩn D cho HPLC (4.15). Hệ số pha loãng D có thể được tính theo công thức sau:

$$D = \frac{w_s}{p_{std}} \cdot \frac{m_t}{V_e}$$

Trong đó:

w_s là nồng độ kháng sinh trong mẫu, tính bằng kilogam trên mililít (mg/kg);

p_{std} là nồng độ của chuẩn dùng cho HPLC, tính bằng microgam trên mililít ($\mu\text{g/ml}$);

m_t là khối lượng phần mẫu thử, tính bằng gam (g);

V_e là thể tích dịch chiết, tính bằng mililít (ml).

Lọc dịch chiết nói trên hoặc rửa giải qua màng lọc 0,45 μm trước khi phân tích trên HPLC.

8.3. Phân tích HPLC

8.3.1. Điều kiện sắc kí

a) Các thông số phân tách bằng HPLC

- cột sắc kí: theo 5.1.7
- pha động: theo 4.10.2
- tốc độ dòng: 0,7 ml/min
- bước sóng detector: 520 nm
- tốc độ ghi: 0,5 cm/min
- thể tích bơm: 100 μl
- cột bảo vệ: theo 5.1.8 (chú ý thường xuyên thay mới cột bảo vệ, nhất là đối với mẫu dạng vết)
- độ nhạy máy ghi: được điều chỉnh để có được độ chệch từ 50 % đến 60 % trên toàn thang đo đối với chuẩn B cho HPLC (4.15) đối với mẫu có chứa mức thấp và chuẩn D cho HPLC đối với mẫu bổ sung thuốc thú y.

b) Điều kiện phản ứng sau cột:

- bộ phận phản ứng sau cột: Theo 5.1.5
- pha động : Theo 4.10.1
- tốc độ dòng: 0,9 ml/min
- nhiệt độ buồng phản ứng: 98 °C

Cần đáp ứng các tiêu chí về sự phù hợp của hệ thống theo 8.3.2. Cả ba chất chuẩn ionophore và các thành phần phụ phải được phân giải tốt trong điều kiện sắc kí, tuy nhiên, thành phần phụ của salinomycin có thể xuất hiện như một pic biên đứng phía trước pic narasin. Sử dụng cột Nucleosil (5.1.7) với các điều kiện như trên, thời gian lưu tương ứng đối với monensin B, monensin A, salinomycin, narasin A và narasin (D + I) phải xấp xỉ 8,7 min, 9,8 min, 11,2 min, 12,8min và 14,6 min.

Tốc độ dòng và pha động đối với cột phân tích có thể dao động nhẹ, tuy nhiên tổng tốc độ dòng phải nằm trong khoảng từ 1,5 ml/min đến 1,6 ml/min để cho phép thời gian phản ứng ít nhất là 1min. Độ nhạy được xác định bởi các điều kiện phản ứng và tín hiệu detector/nhiều.

Maduramicin là một chất cản trở chính khi mẫu phân tích có dạng vết đối với salinomycin; maduramicin được rửa giải khoảng 0,3 min trước salinomycin. Semduramicin là chất cản trở chính khi phân tích monensin; nó được rửa giải khoảng 0,4 min trước monensin B. Cả maduramicin và semduramicin cho thấy độ nhạy thấp và có thể xử lý hiệu quả bằng quy trình khẳng định trong Điều 9.

8.3.2. Đánh giá sự phù hợp của hệ thống**8.3.2.1. Độ phân giải**

Bơm hỗn hợp chuẩn D dùng cho HPLC (4.15).

Tính hệ số phân giải F_R đối với các cặp pic cạnh nhau như sau:

$$F_R = 2 \frac{d_2}{w_1} \frac{d_1}{w_2}$$

Trong đó:

d_n là khoảng cách trên đường nền giữa điểm bắt đầu của sắc đồ và cực đại của pic, tính bằng centimet (cm);

w_n là độ rộng pic trên đường nền, tính bằng centimet (cm);

n là số của pic ($n=1$ hoặc 2).

VÍ DỤ Dữ liệu để tính độ phân giải giữa monensin B (1) và monensin A (2):

$d_1 = 10,38$ cm, $w_1 = 0,46$ cm;

$d_2 = 11,98$ cm, $w_2 = 0,52$ cm;

$$F_R = 2 \frac{11,98}{0,46} \frac{10,38}{0,52} = 3,3$$

Giá trị F_R phải lớn hơn 1,4 đối với tất cả các cặp pic cạnh nhau. Nếu tiêu chí này không được đáp ứng, điều chỉnh các điều kiện HPLC để cải thiện độ phân giải, sau đó lặp lại việc bơm chuẩn và tính.

8.3.2.2. Hệ số đuôi pic

Tính hệ số đuôi pic F_T theo công thức sau: