

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10808:2015**

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI -  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NATRI LASALOCID -  
PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO**

*Animal feeding stuffs -*

*Determination of lasalocid sodium content - High performance liquid chromatographic method*

**HÀ NỘI - 2015**

**Lời nói đầu**

TCVN 10808:2015 được xây dựng dựa theo Commission Regulation (EC) No. 152/2009;

TCVN 10808:2015 do Trung tâm Khảo, kiểm nghiệm và kiểm định giống vật nuôi, thức ăn 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 natri lasalocid – Phương pháp sắc kí lỏng hiệu năng cao

*Animal feeding stuffs – Determination of lasalocid sodium content –  
High performance liquid chromatographic method*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng muối natri lasalocid của axit polyete monocarboxylic tạo thành do *Streptomyces lasaliensis* trong thức ăn chăn nuôi bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao.

Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng đối với premix.

Phương pháp này có giới hạn phát hiện là 5 mg/kg và giới hạn định lượng là 10 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 (ISO 9498) *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử*

### 3 Nguyên tắc

Natri lasalocid được chiết ra khỏi mẫu vào metanol đã axit hóa và được xác định bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) pha đảo sử dụng detector huỳnh quang.

### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

## TCVN 10808:2015

**4.1 Kali dihydro phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).**

**4.2 Axit orthophosphoric,  $w = 85\%$  khối lượng.**

**4.3 Dung dịch axit orthophosphoric,  $c = 20\%$**

Chuyển 23,5 ml axit orthophosphoric (4.2) vào bình định mức 100 ml. Thêm nước đến vạch mức và trộn đều.

**4.4 6-Methyl-2-heptylamin (1,5-dimethylhexylamin),  $w = 99\%$  khối lượng.**

**4.5 Metanol, loại dùng cho HPLC.**

**4.6 Axit clohydric,  $\rho = 1,19$  g/ml.**

**4.7 Dung dịch đệm phosphat,  $c = 0,01$  mol/l**

Hòa tan 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4.1) trong 500 ml nước (4.11), thêm 3,5 ml axit orthophosphoric (4.2) và 10,0 ml 6-methyl-2-heptylamin (4.4). Chính pH đến 4,0 bằng dung dịch axit orthophosphoric (4.3) và pha loãng bằng nước (4.11) đến 1000 ml.

**4.8 Metanol đã axit hóa**

Chuyển 5,0 ml axit clohydric (4.6) vào bình định mức 1000 ml, thêm metanol (4.5) đến vạch và trộn. Dung dịch này cần được chuẩn bị mới trước khi sử dụng.

**4.9 Pha động dùng cho HPLC, dung dịch đệm phosphat : metanol = 5 : 95 (thể tích).**

Trộn 5 ml dung dịch đệm phosphat (4.7) với 95 ml metanol (4.5).

**4.10 Chất chuẩn natri lasalocid có độ tinh khiết đảm bảo,  $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$  (muối natri của axit monocarboxylic polyete được tạo thành bởi *Streptomyces lasaliensis*), kí hiệu E763.**

**4.10.1 Dung dịch chuẩn gốc natri lasalocid, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$**

Cân 50 mg natri lasalocid (4.10), chính xác đến 0,1 mg, vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong metanol đã axit hóa (4.8), thêm cùng loại dung môi đến vạch và trộn. Dung dịch này cần được chuẩn bị mới trước khi sử dụng.

**4.10.2 Dung dịch chuẩn trung gian lasalocid, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$**

Dùng pipet lấy 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc (4.10.1) cho vào bình định mức 100 ml, thêm metanol đã axit hóa (4.8) đến vạch và trộn. Dung dịch này cần được chuẩn bị mới trước khi sử dụng.

**4.10.3 Dung dịch hiệu chuẩn**

Chuyển 1,0 ml, 2,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml và 10,0 ml dung dịch chuẩn trung gian (4.10.2) vào một loạt các bình định mức 50 ml. Thêm metanol đã axit hóa (4.8) đến vạch và trộn. Các dung dịch này chứa nồng độ natri lasalocid tương ứng 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 5,0 µg/ml và 10,0 µg/ml. Các dung dịch này cần được chuẩn bị mới trước khi sử dụng.

**4.11 Nước**, loại dùng cho HPLC.

## **5 Thiết bị, dụng cụ**

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

**5.1 Bể siêu âm** (hoặc nồi cách thủy có lắc), có kiểm soát nhiệt độ.

**5.2 Bộ lọc màng**, cỡ lỗ 0,45 µm.

**5.3 Thiết bị HPLC có hệ thống bơm**, thích hợp để bơm các thể tích 20 µl.

**5.3.1 Cột sắc kí lỏng**, kích thước 125 mm x 4 mm, cột C18 pha đảo, cỡ hạt 5 µm hoặc loại tương đương.

**5.3.2 Máy đo phổ huỳnh quang**, có điều chỉnh bước sóng kích thích và bước sóng phát xạ.

**5.4 Cân**, có thể cân được 50 mg, chính xác đến 0,1 mg.

**5.5 Cân**, có thể cân được 2 g, chính xác đến 0,001 g.

**5.6 Cân**, có thể cân được 10 g, chính xác đến 0,01 g.

**5.7 Pipet**, có thể phân phối các thể tích thích hợp.

**5.8 Bình định mức**, dung tích 50 ml, 100 ml và 1000 ml.

**5.9 Bình nón**, dung tích 250 ml.

## **6 Lấy mẫu**

Mẫu phải đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi chất lượng trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Nên lấy mẫu theo TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*.

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

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

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Yêu cầu chung

#### 8.1.1 Mẫu trắng

Để thực hiện phép kiểm tra độ thu hồi (8.1.2), cần phân tích mẫu trắng để chắc chắn rằng không có mặt natri lasalocid cũng như các chất gây nhiễu. Mẫu trắng phải cùng loại với mẫu thử nhưng không phát hiện có mặt natri lasalocid hoặc chất gây nhiễu.

#### 8.1.2 Kiểm tra độ thu hồi

Kiểm tra độ thu hồi bằng cách phân tích mẫu trắng được bổ sung một lượng natri lasalocid tương tự lượng dự kiến đó có mặt trong mẫu. Để bổ sung ở mức 100 mg/kg, chuyển 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc (4.10.1) vào bình nón 250 ml và làm bay hơi dung dịch đến khoảng 0,5 ml. Thêm 50 g mẫu trắng, trộn đều và để 10 min rồi trộn lại vài lần trước khi tiến hành chiết (8.2).

Nếu không có sẵn mẫu trắng loại tương tự mẫu thử (xem 8.1.1) thì có thể kiểm tra độ thu hồi bằng phương pháp thêm chuẩn. Trong trường hợp này, các mẫu cần phân tích được bổ sung một lượng natri lasalocid tương tự với lượng có trong mẫu. Mẫu này được phân tích cùng với các mẫu không bổ sung chất chuẩn và tính độ thu hồi từ kết quả thu được.

## 8.2 Chiết

### 8.2.1 Thức ăn chăn nuôi

Cân từ 5 g đến 10 g mẫu thử, chính xác đến 0,01 g, cho vào bình nón 250 ml có nắp đậy. Dùng pipet thêm 100,0 ml metanol đã axit hóa (4.8). Đậy lỏng nắp và xoay bình để hòa tan mẫu. Đặt bình nón vào bể siêu âm (5.1) để ở khoảng 40 °C trong 20 min, sau đó lấy ra và làm nguội đến nhiệt độ phòng. Để yên khoảng 1 h cho đến khi các chất lơ lửng lắng xuống, sau đó lọc phần lỏng qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 µm (5.2) vào một bình thích hợp. Tiến hành xác định bằng HPLC (8.3).

### 8.2.2 Premix

Cân khoảng 2 g premix chưa nghiền, chính xác đến 0,001 g, cho vào bình định mức 250 ml. Thêm 100,0 ml metanol đã axit hóa (4.8) và xoay bình để hòa tan. Đặt bình này và các lượng chứa vào bể siêu âm (5.1) ở khoảng 40 °C trong 20 min, sau đó lấy bình ra và để nguội đến nhiệt độ phòng. Pha loãng bằng metanol đã axit hóa (4.8) đến vạch và trộn đều. Để yên 1 h cho đến khi các chất lơ lửng lắng xuống, sau đó lọc phần lỏng qua bộ lọc màng cỡ lỗ 0,45 µm (5.2). Pha loãng một thể tích thích hợp của dịch lọc trong với metanol đã axit hóa (4.8) để có dung dịch thử cuối cùng có nồng độ natri lasalocid khoảng 4 µg/ml. Tiến hành xác định bằng HPLC (8.3).

### 8.3 Xác định bằng HPLC

#### 8.3.1 Thông số

Nên sử dụng các điều kiện sau đây, có thể sử dụng các điều kiện khác nếu cho kết quả tương đương:

- Cột sắc kí lỏng (5.3.1): kích thước 125 mm x 4 mm, cột C18 pha đảo, cỡ hạt 5 µm hoặc loại tương đương;
- Pha động (4.9): Hỗn hợp dung dịch đệm phosphat (4.7) và metanol (4.5) = 5 : 95 (thể tích);
- Tốc độ dòng: 1,2 ml/min;
- Thể tích bơm: 20 µl;
- Bước sóng phát hiện:
  - Kích thích: 310 nm
  - Phát xạ: 419 nm

Kiểm tra sự ổn định của hệ thống sắc kí bằng cách bơm vài lần dung dịch hiệu chuẩn (4.10.3) có nồng độ natri lasalocid 4,0 µg/ml, cho đến khi đạt được chiều cao (diện tích) pic và thời gian lưu ổn định.

#### 8.3.2 Dựng đường chuẩn

Bơm mỗi dung dịch hiệu chuẩn (4.10.3) vài lần và xác định chiều cao (diện tích) pic trung bình đối với mỗi nồng độ. Dựng đường chuẩn bằng cách sử dụng chiều cao (diện tích) pic trung bình trên trục tung và nồng độ tương ứng tính bằng µg/ml trên trục hoành.

#### 8.3.3 Dung dịch mẫu

Bơm dịch chiết mẫu thu được trong 8.2.1 hoặc 8.2.2 vài lần, sử dụng cùng một thể tích như đã dùng đối với dung dịch hiệu chuẩn và xác định chiều cao (diện tích) trung bình của pic natri lasalocid.

Từ chiều cao (diện tích) pic trung bình của dung dịch mẫu (8.3.3), xác định nồng độ natri lasalocid (µg/ml) bằng cách đối chiếu với đường chuẩn.

## 9 Tính kết quả

### 9.1 Thức ăn chăn nuôi

Tính hàm lượng natri lasalocid trong mẫu,  $w$  (mg/kg), theo công thức sau:

$$w = \frac{c \times V_1}{m}$$

## TCVN 10808:2015

Trong đó:

$c$  là nồng độ natri lasalocid trong dung dịch mẫu (8.2.1), tính bằng microgam trên mililit ( $\mu\text{g/ml}$ );

$V_1$  là thể tích dịch chiết mẫu theo 8.2.1 tính bằng mililit (ml) (trong trường hợp này là 100);

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

### 9.2 Premix

Tính hàm lượng natri lasalocid trong mẫu,  $w$  (mg/kg), theo công thức sau:

$$w = \frac{c \times V_2 \times f}{m}$$

Trong đó:

$c$  là nồng độ natri lasalocid trong dung dịch mẫu (8.2.1), tính bằng microgam trên mililit ( $\mu\text{g/ml}$ );

$V_2$  là thể tích dịch chiết mẫu theo 8.2.2 tính bằng mililit (ml) (trong trường hợp này là 250);

$f$  là hệ số pha loãng theo 8.2.2;

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

## 10 Đánh giá xác nhận kết quả

### 10.1 Nhận biết

Các phương pháp đo phổ huỳnh quang ít bị nhiễu hơn so với phương pháp sử dụng detector UV. Việc nhận biết chất phân tích có thể được khẳng định bằng đồng sắc kí.

#### 10.1.1 Đồng sắc kí

Bổ sung một thể tích thích hợp dung dịch hiệu chuẩn (4.10.3) vào dịch chiết mẫu (8.2.1 hoặc 8.2.2). Lượng natri lasalocid bổ sung phải xấp xỉ lượng natri lasalocid dự kiến tìm thấy trong dịch chiết mẫu.

Chỉ có chiều cao pic natri lasalocid tăng sau khi tính cả lượng bổ sung natri lasalocid và độ pha loãng của dịch chiết. Sai khác về chiều rộng pic tại điểm giữa chiều cao phải nằm trong phạm vi  $\pm 10\%$  chiều rộng chân pic của dịch chiết mẫu chưa bổ sung.

## 11 Độ lặp lại và độ thu hồi

### 11.1 Độ lặp lại

Chênh lệch giữa kết quả của hai phép xác định song song, thực hiện trên cùng một mẫu không được vượt quá các giá trị sau:

- 15 % giá trị cao hơn, khi hàm lượng natri lasalocid trong khoảng từ 30 mg/kg đến 100 mg/kg;
- 15 mg/kg, khi hàm lượng natri lasalocid từ 100 mg/kg đến 200 mg/kg;
- 7,5 %, giá trị cao hơn, khi hàm lượng natri lasalocid trên 200 mg/kg.

### 11.2 Độ thu hồi

Đối với các mẫu thức ăn chăn nuôi (mẫu trắng) được thêm chuẩn, độ thu hồi ít nhất là 80 %. Đối với các mẫu premix (mẫu trắng) được thêm chuẩn thì độ thu hồi ít nhất là 90 %.

## 12 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 dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**  
(Tham khảo)

**Kết quả của phép thử nghiệm cộng tác**

Một nghiên cứu cộng tác đã được tổ chức thực hiện trên hai mẫu premix (mẫu 1 và mẫu 2) và 5 mẫu thức ăn chăn nuôi (từ mẫu 3 đến mẫu 7) do mười hai phòng thử nghiệm tham gia. Trên mỗi mẫu đã thực hiện hai phép phân tích lặp lại.

Kết quả của phép thử nghiệm cộng tác được nêu trong Bảng A.1.

**Bảng A.1 – Kết quả của phép thử nghiệm cộng tác**

	Mẫu 1 premix cho gà	Mẫu 2 premix cho gà tây	Mẫu 3 dạng viên cho gà tây	Mẫu 4 thức ăn dạng mảnh cho gà	Mẫu 5 thức ăn cho gà tây	Mẫu 6 thức ăn A cho gia cầm	Mẫu 7 thức ăn B cho gia cầm
Số lượng phòng thử nghiệm	12	12	12	12	12	12	12
Số lượng kết quả riêng rẽ	23	23	23	23	23	23	23
Giá trị trung bình [mg/kg]	5050	16200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
Độ lệch chuẩn lặp lại $s_r$ [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
Hệ số biến thiên lặp lại [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
Độ lệch chuẩn tái lập $s_R$ [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
Hệ số biến thiên tái lập [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Hàm lượng danh định [mg/kg]	5000 [*]	16000 [*]	80 [*]	105 [*]	120 [*]	50 [**]	35 [**]
* Hàm lượng được công bố bởi nhà sản xuất.							
** Mẫu do phòng thử nghiệm chuẩn bị.							