

BỘ THỦY SẢN**QUYẾT ĐỊNH của Bộ trưởng Bộ Thủy sản số 06/2003/QĐ-BTS ngày 30/5/2003 về việc ban hành Tiêu chuẩn cấp ngành.****BỘ TRƯỞNG BỘ THỦY SẢN**

Căn cứ Nghị định số 50/CP ngày 21 tháng 6 năm 1994 của Chính phủ về nhiệm vụ, quyền hạn và tổ chức bộ máy của Bộ Thủy sản;

Theo đề nghị của Vụ trưởng Vụ Khoa học, công nghệ,

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này 05 Tiêu chuẩn cấp ngành sau đây:

1. 28 TCN 182 : 2003: Sulfit trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng.
2. 28 TCN 183 : 2003: Axit boric và muối borat trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định tính.
3. 28 TCN 184: 2003: Ure trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định tính.
4. 28 TCN 185: 2003: Muối polyphosphat trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký ion.
5. 28 TCN 186: 2003: Hàm lượng cloramphenicol trong sản phẩm thủy sản - Phương pháp định lượng bằng sắc ký khí.

Điều 2. Các tiêu chuẩn trên đây được khuyến khích áp dụng cho các phòng kiểm nghiệm khi tiến hành kiểm tra chất lượng hàng thủy sản và

có hiệu lực thực hiện sau 15 ngày, kể từ ngày đăng Công báo.

Điều 3. Chánh Văn phòng Bộ; Thủ trưởng các vụ, cục; Chánh Thanh tra Bộ; Giám đốc các Sở Thủy sản, Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn có quản lý thủy sản; Giám đốc Trung tâm Kiểm tra chất lượng và vệ sinh thủy sản; Thủ trưởng các đơn vị có phòng kiểm nghiệm nói tại Điều 2 và các cơ sở chế biến thủy sản chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

KT. Bộ trưởng Bộ Thủy sản
Thủ trưởng

NGUYỄN VIỆT THẮNG

Tiêu chuẩn ngành 28 TCN 182: 2003**SULFIT TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN -
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG**

Sulphite in fishery products - Method for quantitative analysis

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng sulfit trong thủy sản và sản phẩm thủy sản. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 10 mg/g.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp của Ủy ban Phân tích thực phẩm khối Bắc Âu NMKL số 132 - 1989 (NODISK METODIKKOMMITTE FOR LIVSMEDEL Nordic committee on food analysis - Sulphite. Spectrophotometric determination in foods).

3. Nguyên tắc

Mẫu sản phẩm được axit hóa bằng axit sulfuric H_2SO_4 và chưng cất trong thiết bị Kjeldahl bán vi lượng. Hơi SO_2 tạo thành phản ứng với 2,2'-đinitro-5,5'-đithiobenzoic axit (DTNB) trong cốc nhận để hình thành phức axit 5-mercapto-2-nitrobenzoic có màu vàng chanh đậm. Cường độ màu của phức axit được đọc trên máy quang phổ tại bước sóng λ là 412 nm. Nồng độ của SO_2 trong mẫu được tính toán theo cường độ màu của phức axit theo phương pháp ngoại chuẩn.

4. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Máy xay thịt có đường kính lỗ đĩa 2 - 3 mm.

4.1.2. Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.

4.1.3. Máy nghiền đồng thể.

4.1.4. Bộ chưng cất Kjeldahl bán vi lượng, dung tích 100 ml.

4.1.5. Máy quang phổ UV-VIS.

4.1.6. Bình tam giác dung tích 100 ml.

4.1.7. Máy đo pH.

4.1.8. Pipet thể tích 5 ml.

4.1.9. Bình định mức dung tích 50 ml.

4.1.10. Bình định mức dung tích 100 ml.

4.1.11. Bình tam giác dung tích 250 ml.

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

4.2.1. Axit sulfuric (H_2SO_4) đậm đặc.

4.2.2. Đikali hydrophosphat ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$). MW = 228,23 g/mol.

4.2.3. Kali hydrophosphat (KH_2PO_4).

4.2.4. Axit clohydric (HCl) 0,1M dùng để chuẩn độ.

4.2.5. Natri hydroxit (NaOH), 0,1M dùng để chuẩn độ.

4.2.6. Axit 2,2'-đinitro-5,5'-đithiobenzoic (DTNB) ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$).

4.2.7. Hồ tinh bột.

4.2.8. Etanol 96%.

4.2.9. Muối đinatri etylendiamin tetraaxetat ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) (EDTA). MW = 372,24 g/mol.

4.2.10. Natri đisulfit ($Na_2S_2O_5$). MW = 190,10 g/mol.

4.2.11. Khí nitơ (N_2).

4.3. Dung dịch chuẩn và dung dịch thử

4.3.1. Dung dịch chuẩn gốc iot 0,05 M: sử dụng ống chuẩn iot (Iodine titrisol) N/10, pha trong 1000 ml. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tháng.

4.3.2. Dung dịch chuẩn iot 0,005M: pha loãng dung dịch (4.3.1) ra 10 lần. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tháng.

4.3.3. Axit sulfuric 10N: đổ từ từ 272 ml axit sulfuric đậm đặc (4.2.1) vào 700 ml nước cất và định mức đến 1000 ml. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 năm.

4.3.4. Dung dịch đệm phosphat pH = 8: hòa tan 3,65hg đikali hydrophosphat $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (4.2.2) và 0,25 g Kali hydrophosphat KH_2PO_4 (4.2.3) với 900 ml nước cất. Chỉnh pH = 8,0 với axit clohydric HCl 0,1 M (4.2.4) hoặc natri hydroxit NaOH 0,1M (4.2.5). Định mức đến 1000 ml. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tháng.

4.3.5. Dung dịch thuốc thử 2,2'-đinitro-5,5'-đithiobenzoic axit (DTNB): hòa tan 1g DTNB trong 100 ml etanol (4.2.8) và định mức đến 1000 ml với dung dịch đệm (4.3.4). Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tháng.

4.3.6. Dung dịch hồ tinh bột: trộn 1 g hồ tinh bột (4.2.7) với 100 ml nước cất rồi đun sôi và làm nguội. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tuần.

4.3.7. Dung dịch gốc disulfit (0,05M): hòa tan 2,3763 g natri disulfit (4.2.10) và 0,0093 g EDTA (4.2.9) trong nước và định mức đến 250 ml. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tháng. Định phân lại nồng độ ở mỗi lần khi sử dụng.

4.3.8. Dung dịch disulfit (0,0005 M) (0,064mg SO₂/ml): dùng pipet hút 10 ml dung dịch gốc disulfit (4.3.7), thêm 0,037 g EDTA (4.2.9), hòa tan rồi định mức đến 1000 ml. Dung dịch có thể sử dụng trong vòng 1 tháng. Định phân lại nồng độ ở mỗi lần khi sử dụng.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu

5.1.1. Chuẩn bị mẫu thử: đồng nhất mẫu thử bằng máy nghiền đồng thể (4.1.3). Cân 2 mẫu, mỗi mẫu 5,00 g trong cốc có mỏ 100 ml. Trộn đều mẫu đã cân với 15 ml nước cất.

5.1.2. Chuẩn bị mẫu trắng: mẫu trắng là mẫu được xác định trước không chứa sulfite. Chuẩn bị mẫu trắng giống như đối với chuẩn bị mẫu thử quy định tại Điều 5.1.1.

5.2. Lập đường chuẩn

5.2.1. Cho vào 2 bình tam giác dung tích 250 ml (4.1.11), mỗi bình 5 ml dung dịch chuẩn iot (4.3.2).

5.2.2. Chuẩn độ với dung dịch chuẩn disulfit (4.3.8) đến màu vàng nhạt.

5.2.3. Thêm dung dịch hồ tinh bột (4.3.6) và tiếp tục chuẩn độ cho đến khi dung dịch đổi màu.

5.2.4. Dùng pipette nhỏ lần lượt 0,1, 2, 3, 4, và 5 ml dung dịch disulfit (4.3.8) đã được chuẩn độ tại Điều 5.2.3 vào trong các bình định mức 50 ml có chứa 25 ml dung dịch thuốc thử (4.3.5). Sau đó, pha loãng đến vạch với dung dịch đệm phosphat (4.3.4) rồi để yên trong 10 phút.

5.2.5. Hiệu chỉnh máy quang phổ (4.1.5) với nước cất ở 412 nm (độ hấp thụ là 0 đối với nước cất). Xác định lần lượt độ hấp thụ của các dung dịch (5.2.4) bằng máy quang phổ.

5.2.6. Thành lập đồ thị theo các giá trị của độ hấp thụ và nồng độ sulfite của dãy chuẩn theo mg/ml. Hàm lượng SO₂ trong dịch mẫu được tính theo đường hồi quy tuyến tính của đồ thị thu được sau khi hiệu chỉnh với giá trị hấp thụ của mẫu trắng.

5.3. Tiến hành thực nghiệm

5.3.1. Chuyển mẫu trắng và các mẫu thử đã chuẩn bị theo Điều 5.1 lần lượt vào các bình chưng cất. Rửa các cốc đựng mẫu với 10 ml nước cất rồi cho hết vào bình chưng cất. Lắp đặt bình vào bộ chưng cất Kjeldahl (4.1.4).

5.3.2. Đặt bình tam giác thu hồi chứa 50 ml DTNB (4.3.5) ở đầu ra của ống ngưng tụ. Nối các đường dẫn khí nitơ và nước làm nguội vào thiết bị chưng cất.

5.3.3. Cho vào bình chưng cất 20 ml axit sulfuric 10 N (4.3.3) qua chiếc phễu gắn ở phía trên bộ chưng cất và nhanh chóng đóng kín hệ thống lại. Chưng cất trong vòng 4 phút.

5.3.4. Lấy bình hứng ra khỏi bộ chưng cất. Rửa bình ngưng và ống nối với dung dịch đệm phosphat (4.3.4), chuyển dịch rửa vào bình thu hồi.

5.3.5. Chuyển toàn bộ dịch cất vào bình định

mức (4.1.9) rồi rửa bình thu hồi với dung dịch đệm phosphat (4.3.4). Chuyển dịch rửa vào bình định mức rồi định mức với dung dịch đệm (4.3.4).

5.3.6. Đọc chỉ số ABS sau 10 phút với bước sóng 412 nm và dùng nước cất là dung dịch so sánh. Nếu trị số ABS > 1,5, phải pha loãng dung dịch với hỗn hợp với tỷ lệ 1:1 của dung dịch đệm phosphat (4.3.4) và dung dịch thuốc thử (4.3.5) rồi tiến hành đọc lại.

6. Tính kết quả

6.1. Tính nồng độ dung dịch gốc disulfua theo công thức sau:

$$C_{SO_2} \text{ (mg/ml)} = \frac{V_0 \times C_0 \times MV}{V_{SO_2}} \times 1000.$$

Trong đó:

- V_0 là số ml dung dịch iot (4.3.1) được sử dụng tại Điều 5.2.1.

- V_{SO_2} là số ml dung dịch gốc disulfit (4.3.7) dùng cho chuẩn độ,

- C_0 là nồng độ của dung dịch iot (4.3.1), tính theo mol/l,

- MV là phân tử gam của SO_2 (64,06 g/mol).

6.2. Tính hàm lượng SO_2 trong mẫu

6.2.1. Tính lượng SO_2 trong dung dịch mẫu từ đường chuẩn theo Điều 5.2.6.

6.2.2. Tính nồng độ SO_2 trong mẫu theo công thức sau:

$$C_{SO_2} \text{ (mg/kg)} = \frac{A \times V \times \gamma}{m} \times 1000$$

Trong đó:

- A là nồng độ SO_2 tìm thấy từ đường chuẩn, tính theo mg/ml,

- V là thể tích của dịch cất (5.3.5), tính theo ml,

- γ là hệ số pha loãng tại Điều 5.3.6, $\gamma = 1$ nếu không pha loãng,

- m là khối lượng mẫu cân, tính theo g.

6.3. Báo cáo kết quả

Hàm lượng của sulfit là giá trị trung bình của 2 lần thử song song tính theo mg/kg.

Tiêu chuẩn ngành 28 TCN 183 : 2003

AXIT BORIC VÀ MUỐI BORAT TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH

Boric acid and borates in fishery products - Method for qualitative analysis

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính axit boric và muối borat của nó trong sản phẩm thủy sản. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,1 %.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp chính thức của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích quốc tế AOAC 970.33 -1995 (AOAC official method 970.33 - Boric acid and borates in food) và Thường quy kỹ thuật định tính và bán định lượng axit boric hoặc natri borat trong thực phẩm (Quyết định số 3390/QĐ-BYT ngày 28/9/2000 của Bộ Y tế).

3. Nguyên tắc

Mẫu sản phẩm được chiết thử sơ bộ bằng dung dịch nước cất hoặc thử xác nhận bằng than hóa

trước khi chiết. Axit boric và muối có trong dịch chiết đã được axit hóa tác dụng với curcumin trên giấy nghệ tạo thành phức màu cam đỏ. Trong môi trường hơi amoniac (NH_3) màu cam đỏ chuyển thành màu xanh lục và trở lại màu đỏ bởi hơi axit clohydric (HCl).

4. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Cân phân tích, độ chính xác 0,1 g.

4.1.2. Bình tam giác dung tích 125 ml.

4.1.3. Bình tam giác dung tích 250 ml.

4.1.4. Đũa thủy tinh.

4.1.5. Bếp điện.

4.1.6. Ống nghiệm dung tích 15 ml.

4.1.7. Giấy lọc whatman số 02.

4.1.8. Chén nung bằng sứ.

4.1.9. Lò nung.

4.1.10. Giấy pH.

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

4.2.1. Axit clohydric (HCl) đậm đặc.

4.2.2. Etanol 80 %.

4.2.3. Giấy nghệ: hòa tan 0,5 g curcumin (hoặc 1,5 - 2,0g bột nghệ) trong 100 ml etanol 80 % (4.2.2) trong bình tam giác 250 ml (4.1.3). Lắc mạnh bình trong 5 phút rồi lọc lấy dịch trong. Nhúng tờ giấy lọc (4.1.7) vào dung dịch vừa lọc rồi để khô. Sau 1 giờ, cắt giấy nghệ thành những mảnh có kích thước 6×1 cm. Bảo quản giấy nghệ ở chỗ tối, tránh ánh sáng.

4.2.4. Dung dịch amoni hydroxit (NH_4OH) đậm đặc.

4.2.5. Nước vôi hoặc sữa vôi.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Thử sơ bộ

5.1.1. Dùng đũa thủy tinh (4.1.4) khuấy trộn đều 25 g mẫu đã xay nghiền với 10 ml nước cất trong bình tam giác 125 ml (4.1.2) rồi đậy miệng bình bằng mặt kính đồng hồ.

5.1.2. Đun từ từ bình tam giác trên bếp điện (4.1.5) cho đến sôi dung dịch. Chú ý phải lắc đều khi đun. Làm nguội mẫu rồi lọc dịch trong bằng giấy lọc (4.1.7).

5.1.3. Axit hóa dịch lọc bằng axit HCl (4.2.1) tới khi $\text{pH} = 5$ rồi rót dịch vào trong ống nghiệm 15 ml (4.1.6).

5.1.4. Nhúng một đầu giấy nghệ (4.2.3) vào trong ống nghiệm chứa dịch mẫu cho ngập khoảng 1/2 chiều dài tờ giấy. Lấy giấy ra rồi để khô tự nhiên. Quan sát màu của giấy thử, tiến hành đọc kết quả theo Điều 6.

5.2. Thử xác nhận

Tiến hành thử khẳng định đối với các mẫu cho kết quả dương tính trong phép thử sơ bộ theo quy trình sau:

5.2.1. Kiểm hóa 25 g mẫu với nước vôi hoặc sữa vôi trong chén sứ (4.1.8).

5.2.2. Đun từ từ mẫu trong chén sứ trên bếp điện (4.1.5) cho bay hơi đến khô.

5.2.3. Đặt chén sứ vào trong lò nung (4.1.9) ở nhiệt độ 350°C trong 4 giờ cho đến khi các chất hữu cơ cháy thành than hoàn toàn. Sau đó, để nguội rồi hòa tan cặn với 4 ml nước cất và thêm từng giọt axit HCl (4.2.1) cho đến khi dung dịch có tính axit rõ rệt ($\text{pH} = 5$). Lọc dung dịch vào ống nghiệm (4.1.6).

5.2.4. Nhúng một đầu giấy nghệ (4.2.3) vào

trong ống nghiệm chứa dịch mẫu cho ngập khoảng 1/2 chiều dài tờ giấy. Lấy giấy ra rồi để khô tự nhiên. Quan sát màu của giấy thử, tiến hành đọc kết quả Điều 6.

6. Đọc kết quả

Nếu có borat trong mẫu thì giấy nghệ chuyển sang màu cam đỏ đặc trưng. Đặt giấy nghệ lên miệng ống nghiệm chứa dung dịch amoni hydroxit NH_4OH (4.2.4). Giấy nghệ phải chuyển sang màu xanh lục và trở lại màu đỏ khi đặt giấy trên ống nghiệm chứa axit HCl (4.2.1).

Tiêu chuẩn ngành 28 TCN 184: 2003

URÊ TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH

Urea in fishery products - Method for qualitative analysis

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định tính urê trong sản phẩm thủy sản. Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,5 %.

2. Nguyên tắc

Mẫu sản phẩm được chiết với dung dịch nước. Urê có trong dịch chiết phản ứng với thuốc thử p-dimetylaminobenzaldehyt tạo phức màu vàng chanh đặc trưng.

3. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch

3.1. Thiết bị, dụng cụ

3.1.1. Cân phân tích, độ chính xác 0,1 mg.

3.1.2. Giấy lọc Whatman số 40.

3.1.3. Bếp điện.

3.1.4. Máy nghiền đồng thể.

3.1.5. Bình tam giác dung tích 50 ml.

3.1.6. Đũa thủy tinh.

3.1.7. Mặt kính đồng hồ.

3.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

3.2.1. P-dimetylaminobenzaldehyt.

3.2.2. Etanol, 95%.

3.2.3. Axit clohydric đậm đặc, 12 M.

3.3. Thuốc thử

Dung dịch p-dimetylaminobenzaldehyt (DMAB): hòa tan 8,00 g DMAB (3.2.1) trong 500 ml etanol (3.2.2) rồi thêm 50 ml axit clohydric (3.2.3). Bảo quản dung dịch nơi tránh ánh sáng. Dung dịch sử dụng được trong vòng 1 tháng. Pha loãng dung dịch 10 lần trước khi sử dụng và chỉ sử dụng trong ngày.

4. Phương pháp tiến hành

4.1. Chuẩn bị mẫu

4.1.1. Đồng nhất khoảng 200 g mẫu thủy sản bằng máy nghiền đồng thể (3.1.4).

4.1.2. Cân 25 g mẫu đã xay nghiền đưa vào bình tam giác dung tích 50 ml. Thêm 25 ml nước cất rồi khuấy trộn đều bằng đũa thủy tinh (3.1.6). Sau đó, đậy miệng bình bằng mặt kính đồng hồ (3.1.7).

4.1.3. Đun từ từ bình tam giác trên bếp điện (3.1.3) cho đến sôi. Chú ý, khi đun phải lắc đều. Làm nguội mẫu rồi dùng giấy lọc Whatman (3.1.2) để lọc lấy dịch trong.

4.2. Tiến hành

4.2.1. Nhỏ 5 - 6 giọt dịch mẫu vào trong ống

nghiệm chứa 5 ml dung dịch thuốc thử urê (3.3).
Đun nóng dung dịch trong 1 phút.

4.2.2. Quan sát màu dung dịch. Tiến hành đọc kết quả theo Điều 5.

5. Đọc kết quả

Kết luận mẫu có urê nếu mẫu dung dịch trong ống nghiệm chuyển sang màu vàng chanh đậm. Nồng độ của urê trong mẫu càng cao thì màu vàng của dung dịch càng đậm.

Tiêu chuẩn ngành 28 TCN 185: 2003

MUỐI POLYPHOSPHAT TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ ION

Polyphosphate in fishery products - Method for quantitative analysis by ion chromatography

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng muối polyphosphat bao gồm ortophosphat (monophosphat), pyrophosphat (điphosphat), tripolyphosphat trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng sắc ký ion.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp của Trung tâm Hóa học tư pháp quốc gia của Cục Thực phẩm dược phẩm Hoa Kỳ (National Forensic Chemistry Center, U.S. Food and Drug Administration, Cincinnati, Ohio : Determination of tripolyphosphate and related hydrolysis products in processed shrimp).

3. Nguyên tắc

Polyphosphat trong mẫu thủy sản được chiết

tách bằng nước cất khử ion. Dịch chiết được làm sạch bằng phương pháp chiết pha rắn (SPE) trên cột chiết pha rắn C18. Hàm lượng polyphosphat có trong dịch chiết được xác định trên máy sắc ký ion sử dụng hệ thống phản ứng sau cột với tác chất phản ứng là sắt nitrat trong axit perchloric và đầu dò UV tại bước sóng λ là 330 nm theo phương pháp ngoại chuẩn.

4. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch chuẩn và dung dịch thử

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Hệ thống máy sắc ký ion có đầu dò UV (sau đây gọi tắt ICUV).

4.1.2. Hệ thống phản ứng sau cột gắn ngay sau cột sắc ký với sơ đồ lắp đặt theo Hình 1; ống phản ứng teflon dung tích 0,5 ml.

4.1.3. Cột sắc ký Dinex Ion Pac AS7 tách an-
ion, kích thước cột L x ID: 250 x 4 mm, tiền cột IonPac NG1 (4 x 50 mm).

4.1.4. Máy lắc mẫu.

4.1.5. Cân phân tích có độ chính xác 0,0001 g.

4.1.6. Máy ly tâm có khả năng làm việc ở tốc độ 3000 vòng/phút.

4.1.7. Màng lọc mẫu 0,45 μ m, loại bằng nylon chịu dung môi.

4.1.8. Cột chiết pha rắn C18, loại chứa 300 mg C18.

4.1.9. Chai nhựa chứa mẫu dung tích 100 ml.

4.1.10. Xilanh thủy tinh hoặc nhựa loại 100 ml.

4.1.11. Bể siêu âm.

4.1.12. Dụng cụ thủy tinh phòng thí nghiệm.

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng phân tích, gồm:

4.2.1. Chất chuẩn natri tripolyphosphat ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) của hãng Monsanto hoặc hãng khác có chỉ số kỹ thuật tương đương.

4.2.2. Chất chuẩn natri pyrophosphat decahydrat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) của hãng Aldrich hoặc hãng khác có chỉ số kỹ thuật tương đương.

4.2.3. Chất chuẩn natri phosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) của hãng EM Science hoặc hãng khác có chỉ số kỹ thuật tương đương.

4.2.4. Axit nitric đậm đặc ($d = 1,41 \text{ g/ml}$, 65 %).

4.2.5. Axit perchloric đậm đặc ($d = 1,75 \text{ g/ml}$, 70 %).

4.2.6. Sắt nitrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$).

4.2.7. Metanol

4.2.8. Nước cất khử ion

4.3. Dung dịch chuẩn và dung dịch thử

4.3.1. Dung dịch chuẩn gốc 1000 $\mu\text{g/ml}$: tùy theo hàm lượng chuẩn trong giấy chứng nhận của các chất chuẩn (4.2.1; 4.2.2 và 4.2.3) để chuẩn bị các dung dịch chuẩn này có hàm lượng 1000 $\mu\text{g/g}$ trong nước cất khử ion (4.2.8).

Chú thích: Bảo quản dung dịch chuẩn trong chai PE ở nhiệt độ phòng trong 1 tháng.

4.3.2. Dung dịch chuẩn làm việc

4.3.2.1. Dung dịch chuẩn làm việc ortophosphat: chuẩn bị 5 dung dịch chuẩn ortophosphat làm việc có nồng độ 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$ từ dung dịch chuẩn ortophosphat 1000 $\mu\text{g/ml}$ (4.3.1) bằng cách pha loãng với nước cất khử ion (4.2.8).

4.3.2.2. Dung dịch chuẩn làm việc pyrophosphat: chuẩn bị 5 dung dịch chuẩn pyrophosphat làm việc có nồng độ 0,5 - 50 $\mu\text{g/ml}$ từ dung dịch chuẩn pyrophosphat 1000 $\mu\text{g/ml}$ (4.3.1) bằng cách pha loãng với nước cất khử ion (4.2.8).

4.3.2.3. Dung dịch chuẩn làm việc tripolyphosphat:

chuẩn bị 5 dung dịch chuẩn tripolyphosphat làm việc có nồng độ 10 - 500 $\mu\text{g/ml}$ từ dung dịch chuẩn tripolyphosphat 1000 $\mu\text{g/ml}$ (4.3.1) bằng cách pha loãng với nước cất khử ion (4.2.8).

Chú thích: Chỉ được sử dụng các loại dung dịch chuẩn làm việc trên đây ngay trong ngày.

4.3.3. Dung dịch axit perchloric 2%: hòa tan 28,5 ml axit perchloric (4.2.5) bằng nước cất khử ion (4.2.8) trong bình định mức 1 lít rồi định mức đến vạch.

4.3.4. Dung dịch phản ứng sau cột: hòa tan 1 g sắt nitrat (4.2.6) trong 1000 ml dung dịch axit perchloric 2% (4.3.3).

4.3.5. Dung dịch pha động (axit nitric 70 mM): hòa tan 4,82 ml axit nitric đậm đặc rồi định mức đến 1000 ml bằng nước cất khử ion (4.2.8). Dưới áp suất khí hòa tan bằng cách đặt vào bể siêu âm trong khoảng 10 - 15 phút trước khi chạy máy sắc ký ion.

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu thử

Cân chính xác 0,5 g mẫu thủy sản (ký hiệu m) đã được đồng nhất vào trong chai nhựa dung tích 100 ml (4.1.9). Thêm 50 ml nước cất khử ion (4.2.8) vào trong chai rồi lắc mạnh trong 30 phút trên máy lắc mẫu (4.1.4). Sau đó, ly tâm chai trong 10 phút ở tốc độ 3000 vòng/phút trên máy ly tâm (4.1.6). Lọc dịch chiết qua màng lọc 0,45 μm (4.1.7).

5.2. Chuẩn bị mẫu trắng

Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng giống như chuẩn bị đối với mẫu thử nhưng thay 0,5 g thủy sản bằng 0,5 ml nước cất đã khử ion.

5.3. Làm sạch dịch chiết

5.3.1. Chuẩn bị cột

Nối cột chiết pha rắn C18 (4.1.8) vào đầu ra

của một xilanh thủy tinh 100 ml (4.1.10). Thêm lần lượt 10 ml metanol (4.2.7), 10 ml nước cất đã khử ion vào xilanh thủy tinh. Loại bỏ dung dịch chảy qua cột.

5.3.2. Làm sạch dịch chiết

Cho dịch chiết thu được tại (5.1) và (5.2) vào các cột C18 đã được chuẩn bị (5.3.1). Sau khi cho dịch chiết vào cột, thu dịch ra khỏi cột vào bình định mức 100 ml (đã bỏ 2 ml dầu). Sau đó, tráng rửa bình chứa 3 lần, mỗi lần bằng 2 ml nước cất khử ion (4.2.8). Cho nước tráng qua cột rồi gom dịch qua cột vào bình định mức trên. Định mức tới vạch bằng nước cất (ký hiệu v). Tiến hành phân tích các dịch thu được trên máy sắc ký ion theo Điều 5.4.

5.4. Tiến hành phân tích trên máy sắc ký ion

5.4.1. Điều kiện phân tích

5.4.1.1. Đặt chế độ làm việc cho máy sắc ký ion như sau:

a) Cột sắc ký ion: Dionex IonPac AS7 (L x ID: 250 x 4 mm, tiền cột IonPac NG1

(L x ID: 4 x 50mm).

b) Nhiệt độ cột: Nhiệt độ trong phòng.

c) Pha động: Dung dịch axit Nitric 70 mM (4.3.5).

d) Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.

đ) Bước sóng cài đặt cho đầu dò UV là 330 nm.

e) Thể tích tiêm: 100 μ l.

5.4.1.2. Điều kiện trong hệ thống phản ứng sau cột:

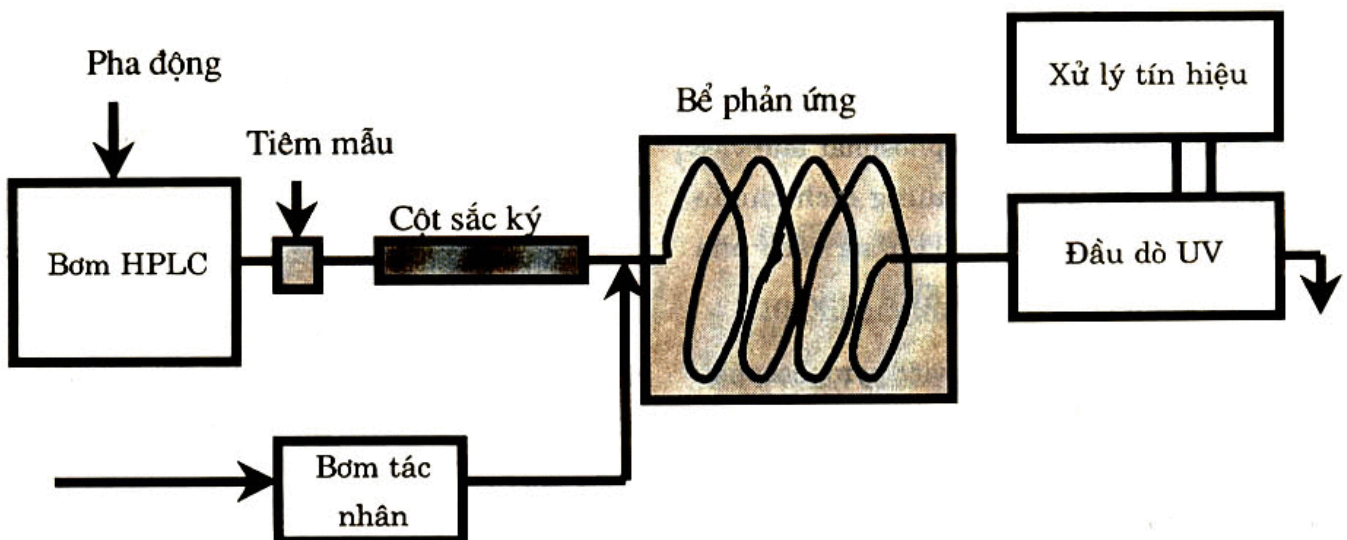
a) Tác nhân: 1g/l sắt nitrat trong axit Percloric 2 % (4.3.4). Tốc độ dòng là 0,5 ml/phút.

b) Nhiệt độ phản ứng trong ống teflon (4.3.4) nhiệt độ trong phòng.

5.4.2. Ổn định cột sắc ký trong 30 phút bằng pha động.

5.4.3. Tiêm các dung dịch chuẩn (4.3.2) vào máy sắc ký. Mỗi dung dịch tiêm 2 lần, tính diện tích pic trung bình. Dụng đường chuẩn biểu thị mối quan hệ giữa các chiều cao pic thu được và nồng độ từng loại phosphat theo quan hệ tuyến tính bậc 1 (phương trình $y = ax + b$).

5.4.4. Tiêm dung dịch mẫu thử và dung dịch mẫu trắng đã được làm sạch (5.3.2) vào hệ thống sắc ký, mỗi mẫu 2 lần. Tính kết quả thu được theo Điều 6.



Hình 1 - Sơ đồ cách lắp đặt hệ thống phản ứng sau cột.

5.5. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

5.5.1. Độ lặp lại của 2 lần tiêm

Độ lệch chuẩn (CV_s) tính theo diện tích pic sắc ký của 2 lần tiêm cùng một dung dịch chuẩn pyrophosphat 10 $\mu\text{g/ml}$ và 25 $\mu\text{g/ml}$ phải nhỏ hơn 1,2 %.

5.5.2. Đường chuẩn đối với mỗi loại phosphat phải có độ tuyến tính tốt, hệ số tương quan hồi quy tuyến tính (R_2) phải lớn hơn hoặc bằng 0,99. Khoảng tuyến tính:

- a) Ortophosphat: 10 - 100 $\mu\text{g/ml}$,
- b) Pyrophosphat: 0,5 - 50 $\mu\text{g/ml}$,
- c) Tripolyphosphat: 10 - 500 $\mu\text{g/ml}$.

6. Tính kết quả

Hàm lượng các phosphat có trong mẫu được tính trên cơ sở đường chuẩn thu được (5.4.3). Với đường chuẩn ở dạng $y = ax + b$, hàm lượng các phosphat có trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{Y - b}{a} \times F$$

Trong đó:

- C là nồng độ các phosphat có trong mẫu, tính theo $\mu\text{g/g}$.

- Y là hiệu số giữa diện tích pic của dịch chiết và diện tích pic có trong mẫu trắng tiêm vào máy, tính theo đơn vị diện tích.

- a, b là các thông số của đường chuẩn được xác định tại Điều 5.4.3.

- F là hệ số pha loãng mẫu và có giá trị bằng tỷ số giữa thể tích dịch chiết thu được sau khi làm sạch v (5.3.2) và khối lượng mẫu m sử dụng (5.1).

Tiêu chuẩn ngành 28 TCN 186: 2003

HÀM LƯỢNG CLORAMPHENICOL TRONG SẢN PHẨM THỦY SẢN - PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG BẰNG SẮC KÝ KHÍ

Chloramphenicol in fishery products - Method for quantitative analysis by Gas Chromatography

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng cloramphenicol (sau đây gọi tắt là CAP) trong thủy sản và sản phẩm thủy sản bằng hệ thống sắc ký khí (sau đây gọi tắt là GC). Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,3 $\mu\text{g/kg}$.

2. Phương pháp tham chiếu

Tiêu chuẩn này được xây dựng dựa theo phương pháp được công bố trong tạp chí của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích; tập 77, số 3, năm 1994 (Journal of AOAC international; Vol. 77, No. 3, 1994: Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp).

3. Nguyên tắc

CAP trong mẫu thủy sản được chiết tách bằng etyl axetat. Dịch chiết sau đó được cô cạn, cạn được xử lý với sylon (chất tạo dẫn xuất trimetylsylyl), để tạo dẫn xuất trimetylsylyl của CAP. Hàm lượng dẫn xuất CAP được xác định trên hệ thống GC với đầu dò bắt giữ điện tử (sau đây gọi tắt là ECD) theo phương pháp nội chuẩn.

4. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất, dung dịch chuẩn và dung dịch thử

4.1. Thiết bị, dụng cụ

4.1.1. Hệ thống GC với đầu dò ECD và bộ phận tiêm mẫu tự động.

4.1.2. Cột mao quản HP-5, kích thước 25m x 0,2 mm, lớp film 5% phenyl metyl silicon dày 0,33 μm hoặc cột tương đương.

4.1.3. Hệ thống cô quay chân không: Buchi R 110 hoặc tương đương.

4.1.4. Hệ thống cô N - Evap model 111 hoặc tương đương.

4.1.5. Xilanh 10 μ l.

4.1.6. Bình quả lê dung tích 100 ml.

4.1.7. Ống ly tâm dung tích 15 ml, 50 ml.

4.1.8. Pipet Pasteur với quả bóp cao su.

4.1.9. Máy ly tâm tốc độ 5000 vòng/phút.

4.1.10. Máy rung trộn mẫu.

4.1.11. Máy nghiền đồng thể.

4.1.12. Bể điều nhiệt.

4.2. Hóa chất

Hóa chất phải là loại tinh khiết được sử dụng để phân tích, gồm:

4.2.1. Etyl axetat.

4.2.2. Nước loại dùng cho HPLC.

4.2.3. Hexan.

4.2.4. Toluen.

4.2.5. Natri clorua (NaCl).

4.2.6. Tác nhân tạo dẫn xuất Trimetyl silyl: Sylon HTP kit.

4.2.7. Chuẩn CAP.

4.2.8. Chất nội chuẩn m-nitro CAP (M-CAP).

4.2.9. Metanol.

4.3. Dung dịch chuẩn và dung dịch thử

4.3.1. Dung dịch muối 4%: hòa tan 40 g NaCl (4.2.5) trong 1000 ml nước cất (4.2.2).

4.3.2. Dung dịch nội chuẩn CAP gốc (100 μ g/ml): cân 10,0 mg CAP (4.2.7) vào bình định mức

dung tích 100 ml. Hòa tan và định mức đến vạch 100 ml bằng metanol (4.2.9).

4.3.3. Dung dịch nội chuẩn CAP làm việc (1000 ng/ml): hút chính xác 1,00 ml dung dịch chuẩn CAP gốc (4.3.2) vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch bằng Metanol (4.2.9).

4.3.4. Dung dịch chuẩn M-CAP gốc (100 μ g/ml): cân 10,0 mg M-CAP (4.2.8) vào bình định mức 100 ml. Hòa tan và định mức đến vạch 100 ml bằng metanol (4.2.9).

4.3.5. Dung dịch chuẩn M-CAP làm việc (1000 ng/ml): hút chính xác 1,00 ml dung dịch chuẩn M-CAP gốc (4.3.4) vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch bằng metanol (4.2.9).

4.3.6. Dung dịch các chuẩn đã được tạo dẫn xuất: hút chính xác 100 μ l dung dịch từ các chuẩn làm việc (4.3.3) và (4.3.5) vào ống ly tâm 15 ml (4.1.7). Làm khô bằng dòng nitơ. Tạo dẫn xuất như được mô tả ở tại Điều 5.4, nhưng thể tích cuối cùng là 1,0 ml.

4.3.7. Dung dịch CAP (100 ng/ml): hút chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn CAP làm việc (4.3.3) vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch bằng metanol (4.2.9).

4.3.8. Dung dịch M-CAP (100 ng/ml): hút chính xác 10,0 ml dung dịch nội chuẩn M-CAP làm việc (4.3.5) vào bình định mức 100 ml, định mức đến vạch bằng metanol (4.2.9).

5. Phương pháp tiến hành

5.1. Chuẩn bị mẫu thử

5.1.1. Cân 10,0 g mẫu thủy sản đã được nghiền nhuyễn cho vào ống ly tâm thủy tinh dung tích 50 ml (4.1.7). Thêm 100 μ l dung dịch M - CAP làm việc (4.3.5) và 20 ml etyl axetat (4.2.1) vào trong ống rồi nghiền bằng máy nghiền đồng thể (4.1.11) trong khoảng 10 -15 giây. Sau đó, ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3000 vòng/phút. Gạn dịch trong vào bình quả lê 100 ml (4.1.6).

5.1.2. Cho thêm 20 ml etyl axetat (4.2.1) vào phần cạn trong ống ly tâm rồi trộn đều. Sau đó, ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3000 vòng/phút. Gạn dịch trong vào bình quả lê ở trên.

5.1.3. Cô dịch trong bình quả lê trên máy cô quay chân không (4.1.3) cho đến khi còn khoảng 2,0 - 4,0 ml dung dịch ở nhiệt độ 50°C. Chuyển dịch còn lại sang ống ly tâm 50 ml bằng pipet Pasteur. Rửa bình quả lê 3 lần, mỗi lần bằng 2,0 ml etyl axetat. Tất cả dịch rửa được cho vào ống ly tâm.

5.1.4. Cô cạn dung dịch trong ống ly tâm bằng dòng khí nitơ ở nhiệt độ 50°C.

5.1.5. Thêm 25 ml dung dịch muối NaCl 4 % (4.3.1), 2 ml metanol (4.2.9) và 15 ml hexan (4.2.3) vào ống ly tâm. Đậy nắp ống ly tâm và lắc thật mạnh trong 1 phút. Sau đó, ly tâm trong 1 phút ở tốc độ 800 vòng/phút.

5.1.6. Loại bỏ lớp hexan ở trên bằng pipet Pasteur (4.1.8). Lặp lại quá trình này thêm 2 lần, mỗi lần 15 ml hexan.

5.1.7. CAP trong pha nước được chuyển sang pha hữu cơ bằng cách lắc mạnh với 15 ml etyl axetat (4.2.1) trong 30 giây. Ly tâm hỗn hợp trong 1 phút ở tốc độ 800 vòng/phút. Dùng pipet Pasteur chuyển lớp etyl axetat ở trên vào bình quả lê 100 ml (4.1.6). Lặp lại quá trình này một lần nữa với 15 ml etyl axetat (4.2.1). Dịch chiết cũng được đưa vào bình quả lê.

5.1.8. Cô hỗn hợp dịch chiết (5.1.7) còn lại khoảng 2 - 4 ml trên máy quay chân không ở nhiệt độ 55°C. Chuyển lượng dịch còn lại vào ống ly tâm 15 ml. Rửa bình quả lê 3 lần, mỗi lần với 2 ml etyl axetat. Cô cạn dịch thu được bằng dòng nitơ ở nhiệt độ 50°C. Chuyển tiếp sang bước tạo dẫn xuất Sylyl theo Điều 5.4.

5.2. Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng được định nghĩa là mẫu thủy sản đã

được xác định không có cloramphenicol. Tiến hành chuẩn bị mẫu trắng giống như chuẩn bị đối với mẫu thử quy định tại Điều 5.1.

5.3. Chuẩn bị mẫu để xác định độ thu hồi

Cho thêm 30,0 µl dung dịch chuẩn CAP 0,1 µg/ml (4.3.7) và 30 µl dung dịch chuẩn M-CAP 0,1 µg/ml (4.3.8) vào 10,0g mẫu trắng rồi tiến hành chuẩn bị mẫu giống như chuẩn bị đối với mẫu thử quy định tại Điều 5.1.

5.4. Tạo dẫn xuất Sylyl

Thêm 100 µl Sylon (4.2.6) vào cạn trong ống ly tâm, đóng nắp rồi lắc mạnh trên máy rung trộn mẫu (4.1.10). Đặt ống ly tâm vào trong bể điều nhiệt (4.1.12) ở nhiệt độ 55°C trong 40 phút. Làm bay hơi dung dịch trong ống cho đến gần khô (lưu ý không để khô hoàn toàn) dưới dòng nitơ tại nhiệt độ trong phòng. Thêm 500 µl toluen rồi lắc mạnh cho tan cạn hoàn toàn.

5.5. Tiến hành phân tích trên hệ thống GC

5.5.1. Điều kiện phân tích

Đặt chế độ làm việc cho hệ thống GC như sau:

a) Chương trình nhiệt độ cột:

- Tăng từ nhiệt độ 150°C lên nhiệt độ 270°C với tốc độ 20°C/phút, giữ 8,5 phút.

- Tăng từ nhiệt độ 270°C lên nhiệt độ 290°C với tốc độ 20°C/phút, giữ 2,0 phút.

b) Nhiệt độ đầu tiêm: 270°C.

c) Nhiệt độ detector: 340°C.

d) Tốc độ dòng khí mang He: 1 ml/phút.

đ) Khí hỗ trợ: N₂, theo điều kiện của GC.

e) Thể tích tiêm: 1 µl.

5.5.2. Ổn định cột sắc ký trong 3 giờ tại chế độ làm việc.

5.5.3. Tiêm các dung dịch chuẩn đã được tạo

dẫn xuất (4.3.6) trước và sau mỗi 5 dung dịch thử. Xác định tỷ số diện tích pic (CAP/ M-CAP).

5.5.4. Tiêm các dung dịch đã được tạo dẫn xuất của mẫu thử, mẫu trắng, mẫu xác định độ thu hồi vào hệ thống GC mỗi mẫu 2 lần. Tính kết quả thu được theo Điều 6.

5.6. Yêu cầu về độ tin cậy của phép phân tích

5.6.1. Độ lặp lại của 2 lần tiêm

Độ lệch chuẩn (CV_s) tính theo diện tích pic sắc ký của 2 lần tiêm cùng một dung dịch chuẩn phải nhỏ hơn 0,5 %.

5.6.2. Độ thu hồi (R)

Độ thu hồi được xác định cho mỗi lần chạy mẫu. Độ thu hồi tính được phải lớn hơn 80 %.

5.6.3. Kiểm tra xác nhận (confirmatory test)

Đối với các mẫu đã phát hiện Cloramphenicol bằng phương pháp GC-ECD này, phải kiểm tra xác nhận kết quả bằng GC-MS.

6. Tính kết quả

Hàm lượng cloramphenicol (C_{CAP}) được tính theo công thức:

$$C_{CAP} = \frac{X \times C \times V}{Y \times W}$$

Trong đó:

- X là tỷ số trung bình diện tích pic (CAP/M-CAP) cho dung dịch mẫu thử.

- C là hàm lượng của CAP trong dung dịch các chuẩn đã được dẫn xuất (4.3.6), tính theo ng/g.

- V là thể tích cuối cùng của dung dịch mẫu thử, tính theo ml.

- Y là tỷ số diện tích trung bình CAP/M-CAP trong dung dịch các chuẩn đã được dẫn xuất (4.3.6).

- W là khối lượng mẫu thử, tính theo g./.

BỘ Y TẾ

QUYẾT ĐỊNH của Bộ trưởng Bộ Y tế số 1847/2003/QĐ-BYT ngày 28/5/2003 về việc ban hành Quy chế kê đơn thuốc và bán thuốc theo đơn.

BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ

Căn cứ Luật Bảo vệ sức khỏe nhân dân ban hành ngày 11/7/1989 và Điều lệ thuốc phòng và chữa bệnh cho người ban hành kèm theo Nghị định số 23/HDBT ngày 24/01/1991 của Hội đồng Bộ trưởng;

Căn cứ Nghị định số 68/CP ngày 11/10/1993 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn, tổ chức bộ máy Bộ Y tế;

Theo đề nghị của Vụ trưởng Vụ Điều trị, Cục trưởng Cục quản lý Dược Việt Nam,

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Quyết định này Quy chế kê đơn thuốc và bán thuốc theo đơn.

Điều 2. Quy chế kê đơn thuốc và bán thuốc theo đơn áp dụng cho việc kê đơn và bán thuốc, cấp thuốc theo đơn điều trị ngoại trú, không áp dụng cho việc kê đơn điều trị nội trú và kê đơn, bán thuốc y học cổ truyền.

Điều 3. Quyết định có hiệu lực sau 15 ngày, kể từ ngày đăng Công báo và thay thế Quyết định số 488/BYT-QĐ ngày 03/4/1995 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành tạm thời Quy chế kê đơn thuốc và bán thuốc theo đơn.

Điều 4. Các Chánh Văn phòng, Chánh Thanh tra, Vụ trưởng Vụ Điều trị Bộ Y tế, Cục trưởng

09/3700

LawSoft * Tel: +84-8-3845 6684 * www.ThuVienPhapLuat.com