

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9780: 2014**

Xuất bản lần 1

**MẬT ONG – XÁC ĐỊNH DƯ LƯỢNG CHLORAMPHENICOL  
BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÝ LỎNG GHÉP KHỐI PHỔ  
LC-MS-MS**

*Honey – Determination of chloramphenicol residue by liquid chromatography mass  
– spectrometry LC-MS-MS*

**HÀ NỘI - 2014**

**Lời nói đầu**

TCVN 9780:2014 do Trung tâm Kiểm tra Vệ sinh Thú y TU1 - Cục Thú y 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.

## Mật ong - Xác định dư lượng chloramphenicol bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS-MS

*Honey – Determination of chloramphenicol residue by liquid chromatography mass - spectrometry LC-MS-MS*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định dư lượng chloramphenicol trong mật ong bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS-MS.

Giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,1 µg / kg.

### 2 Nguyên tắc

Dư lượng chloramphenicol trong mật ong được chiết ra từ mẫu bằng ethylacetate. Dịch chiết được làm sạch và đưa vào phân tích bằng kỹ thuật sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS-MS để xác định và định lượng chloramphenicol có trong mẫu.

### 3 Thuốc thử

Trong tiêu chuẩn này, chỉ sử dụng thuốc thử có cấp độ tinh khiết, phân tích và nước cất hai lần đã khử ion.

3.1 **Chuẩn nội chloramphenicol (CAP-d<sub>5</sub>), 99,0 %;**

3.2 **Chuẩn chloramphenicol (CAP), 98,5 %;**

3.3 **Acetonitril, loại dùng cho LC-MS;**

3.4 **Nước, loại dùng cho LC-MS;**

3.5 **Methanol, loại dùng cho LC-MS;**

3.6 **Ethyl acetate, loại dùng cho HPLC;**

3.7 **n-Hexan, loại dùng cho HPLC;**

3.8 **Axit formic;**

3.9 **Khí argon, tinh khiết 99,9%;**

3.10 **Khí nitơ, tinh khiết 99,9%.**

**3.11 Dung dịch chuẩn gốc CAP, CAP-d<sub>5</sub> 1000 µg / ml trong methanol**

Cân 50 mg chuẩn CAP (3.2) vào các bình định mức dung tích 50 ml (4.4). Hoà tan và định mức đến vạch bằng methanol (3.5) để được dung dịch chuẩn gốc CAP có nồng độ 1000 µg / ml. Dung dịch chuẩn gốc CAP được bảo quản ở -20 °C trong 3 tháng.

Hoà tan chuẩn nội CAP-d<sub>5</sub> (3.1) đóng trong ampul bằng một thể tích methanol (3.5) thích hợp để được dung dịch chuẩn gốc CAP-d<sub>5</sub> có nồng độ 1000 µg / ml. Dung dịch chuẩn gốc CAP-d<sub>5</sub> được bảo quản ở -20 °C trong 3 tháng.

**LƯU Ý:**

- Lượng chuẩn CAP (3.2) phải được điều chỉnh hợp lý để đạt nồng độ chuẩn gốc CAP 1000 µg / ml sau khi tính toán và hiệu chỉnh theo giấy chứng nhận độ tinh khiết của nhà sản xuất.

- Thể tích methanol (3.5) thích hợp phải được điều chỉnh hợp lý để đạt nồng độ chuẩn nội gốc CAP-d<sub>5</sub> 1000 µg / ml tùy theo quy cách đóng gói của nhà sản xuất.

**3.12 Dung dịch chuẩn trung gian CAP, 1 µg / ml trong methanol**

Lấy 100 µL từ dung dịch chuẩn gốc CAP, nồng độ 1000 µg / ml cho vào bình định mức 100 ml (4.4) định mức đến vạch với methanol (3.5). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20 °C trong 1 tháng.

**3.13 Dung dịch chuẩn nội trung gian CAP-d<sub>5</sub>, 1 µg / ml trong methanol**

Lấy 100µL từ dung dịch chuẩn gốc CAP-d<sub>5</sub>, nồng độ 1000 µg / ml cho vào bình định mức 100 ml (4.4), định mức đến vạch với methanol (3.5). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở -20 °C trong 1 tháng.

**3.14 Dung dịch chuẩn làm việc CAP, 10 µg / l trong nước**

Lấy 100 µl dung dịch chuẩn trung gian (CAP 1 µg / ml trong methanol) (3.12) cho vào bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng nước (3.4). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh trong 2 tuần.

**3.15 Dung dịch chuẩn nội làm việc CAP-d<sub>5</sub>, 10 µg / l trong nước**

Lấy 100 µl dung dịch chuẩn trung gian (CAP-d<sub>5</sub>, 1 µg / ml trong methanol) (3.13) cho vào bình định mức 10 ml (4.4), định mức đến vạch bằng nước (3.4). Dung dịch chuẩn này được bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh trong 2 tuần.

**3.16 Pha động**

A: Acetonitril (3.3) + 0,1% axit formic (3.8).

B: Nước (3.4) + 0,1 % axit formic (3.8).

#### 4 Thiết bị, dụng cụ

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

##### 4.1 Hệ thống máy sắc ký lỏng khối phổ LC-MS-MS

- Bơm 2 kênh dung môi biến đổi dòng;

- Detector MS-MS;

- Máy tính và phần mềm phân tích;

- Cột sắc ký RP C18, đường kính trong là 2,1 cm, kích thước hạt nhồi là 1,7  $\mu\text{m}$ , độ dài của cột là 50 mm.

4.2 Ống ly tâm polypropylene, dung tích 50 ml có nắp;

4.3 Ống thủy tinh, dung tích 10 ml;

4.4 Bình định mức, dung tích 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml;

4.5 Pipet tự động, dung tích 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ , 5000  $\mu\text{l}$ ;

4.6 Máy ly tâm lạnh, tốc độ 4000 r / min;

4.7 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,1 mg;

4.8 Bơm hút chân không;

4.9 Bộ bay hơi Nitơ, có điều chỉnh nhiệt độ;

4.10 Bộ hút dung môi tự động, thể tích 25 ml;

4.11 Máy lắc, tốc độ 400 r / min;

4.12 Máy lắc ngang, tốc độ 300 r / min;

4.13 Lọ đựng mẫu, dung tích 2 ml.

4.14 Màng lọc, 0,2  $\mu\text{m}$ , PTFE.

#### 5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này nhưng mẫu phân tích tại phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

#### 6 Chuẩn bị mẫu

##### 6.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cân 2,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml (4.2). Cho vào 80  $\mu$ l dung dịch chuẩn nội làm việc CAP-d<sub>5</sub> có nồng độ 10  $\mu$ g / l (3.15).

## 6.2 Chuẩn bị mẫu trắng

Mẫu trắng là mẫu mật ong đã được xác định không nhiễm chloramphenicol. Mẫu trắng được chuẩn bị như mẫu thử.

## 6.3 Chuẩn bị mẫu kiểm soát

Mẫu kiểm soát được chuẩn bị từ mẫu trắng như mẫu thử nhưng sau khi cân có bổ sung 100  $\mu$ L dung dịch chuẩn làm việc CAP có nồng độ 10  $\mu$ g / l (3.14) vào mẫu. Trộn đều bằng máy lắc, sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

## 6.4 Chuẩn bị mẫu xây dựng đường chuẩn

Mẫu thêm chuẩn được chuẩn bị từ mẫu trắng. Cân 2,0 g mẫu đã đồng nhất vào ống ly tâm 50 ml (4.2), cho dung dịch chuẩn làm việc CAP 10  $\mu$ g / l (3.14) và dung dịch chuẩn nội làm việc CAP 10  $\mu$ g / l (3.15) vào các ống nghiệm có chứa mẫu trắng theo bảng 1. Tiến hành trộn đều bằng máy lắc (4.11) trong 15 s, sau đó để yên 15 min trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

**Bảng 1 - Xây dựng đường chuẩn**

STT	Nồng độ chuẩn thêm vào ( $\mu$ g / l)	Thể tích chuẩn thêm vào ( $\mu$ l)	Nồng độ chuẩn lý thuyết ( $\mu$ g / kg)	Nồng độ chuẩn nội thêm vào ( $\mu$ g / l)	Thể tích chuẩn nội thêm vào ( $\mu$ l)	Nồng độ chuẩn nội ( $\mu$ g / kg)
Mẫu 1	10	10	0,05	10	80	0,4
Mẫu 2	10	20	0,10	10	80	0,4
Mẫu 3	10	50	0,25	10	80	0,4
Mẫu 4	10	100	0,50	10	80	0,4
Mẫu 5	10	200	1,0	10	80	0,4
Mẫu 6	10	400	2,0	10	80	0,4

## 7 Tiến hành thử nghiệm

### 7.1 Chiết mẫu và làm sạch mẫu

Cho 2,0 ml nước (3.4) vào từng lọ mẫu. Trộn đều bằng máy lắc (4.11) trong 30 s. Tiếp theo, thêm vào mỗi ống 8 ml Ethylacetate (3.6). Sau đó lắc bằng máy lắc ngang (4.12) ở tốc độ 300 r / min trong 10 min. Sau khi lắc mẫu, ly tâm ở tốc độ 4000 r / min trong 5 min ở nhiệt độ 4 °C (4.6). Dùng pipet, chuyển 6 ml lớp trên sang ống nghiệm thủy tinh (4.3). Sau đó cho bay hơi bằng bộ bay hơi N<sub>2</sub> (4.9) đến khô ở nhiệt độ 40 °C.

Sau khi bay hơi tới khô, hoà tan lại bằng 0,6 ml n-Hexan (3.7) và 0,45 ml nước (3.4). Trộn đều bằng máy lắc trong 30 s (4.11), ly tâm ở 4000 r / min trong 5 min (4.6). Sau đó loại bỏ lớp trên. Hút lớp dưới, lọc qua màng lọc 0,2  $\mu\text{m}$  (4.14) vào lọ đựng mẫu (4.13).

## 7.2 Tiến hành thử nghiệm trên LC-MS-MS

### 7.2.1 Điều kiện HPLC

- Cột sắc ký RP C18, đường kính trong là 2,1 cm, kích thước hạt nhồi là 1,7  $\mu\text{m}$ , độ dài của cột là 50 mm;

- Nhiệt độ cột theo nhiệt độ phòng;

- Thể tích bơm mẫu: 10  $\mu\text{l}$ ;

- Thời gian phân tích: 3 min;

- Tốc độ dòng toàn phần: 0,3 ml / min;

Pha động: chương trình gradient thể hiện theo bảng 2:

**Bảng 2 - Chương trình pha động**

Thời gian (min)	Tốc độ dòng ( $\mu\text{L}$ / min)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0,1	300	80	20
2,0	300	50	50
3,0	300	80	20

### 7.2.2 Điều kiện trên MS

Điều kiện trên MS như sau:

Kiểu ion hóa: ESI (-);

Nhiệt độ nguồn ion hóa: 120 °C;

Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 400 °C;

Tốc độ dòng khí làm bay hơi dung môi: 500 l / h;

Tốc độ dòng khí qua khối nón: 30 l / h.

Các điều kiện phân ly MS-MS như sau:

Bảng 3 - Điều kiện phân ly MS-MS

Tên hợp chất	Ion sơ cấp (m/z)	Ion thứ cấp (m/z)	Năng lượng mặt nón (V)	Năng lượng va chạm (eV)
CAP	321	152 (*)	-18	15
	321	257	-18	20
CAP-d <sub>5</sub>	326	157	-18	15

GHI CHÚ: ion có kí hiệu (\*) là ion dùng để định lượng.

### 7.3 Trình tự bơm mẫu

7.3.1 Bơm dung môi kiểm tra máy: Nước (3.4);

7.3.2 Bơm các dung dịch lập đường chuẩn;

7.3.3 Bơm mẫu trắng;

7.3.4 Bơm mẫu kiểm soát;

7.3.5 Bơm mẫu thử.

## 8 Tính toán và biểu thị kết quả

### 8.1 Tính hệ số tín hiệu

Tính cho từng chất cần phân tích theo phương trình:  $RF = \frac{Sp}{Sp_{IS}}$

Trong đó: RF: hệ số tín hiệu;

Sp: tổng diện tích pic của các ion thứ cấp của chất cần phân tích;

Sp<sub>IS</sub>: diện tích pic của ion thứ cấp của chất chuẩn nội tương ứng.

### 8.2 Xây dựng đường chuẩn

Xây dựng phương trình bậc nhất giữa hệ số tín hiệu với nồng độ chất chuẩn bổ sung vào mẫu và chuẩn bị mẫu theo mục 6.4. Phương trình có dạng:  $RF = ax + b$ . Trong đó:

- RF: hệ số tín hiệu, tính theo mục 8.1;

- x: nồng độ chất chuẩn thêm vào mẫu, chuẩn bị theo mục 6.4;

- b: điểm cắt của đường chuẩn với trục tung;

- a: hệ số góc của đường chuẩn.



Phương trình đạt yêu cầu khi hệ số hồi quy  $R^2 \geq 0.99$ .

### 8.3 Hàm lượng chất phân tích trong mẫu

Dư lượng chloramphenicol cần phân tích trong mẫu được tính theo phương pháp đường chuẩn xây dựng theo mục 8.2. Nồng độ trong mẫu phân tích được tính theo công thức sau:

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot F}{a}$$

Trong đó:

C: là nồng độ chloramphenicol có trong mẫu, tính bằng  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ;

$C_x$ : là nồng độ chloramphenicol đo được suy ra từ đường chuẩn,  $\mu\text{g} / \text{l}$ ;

V: là thể tích định mức cuối cùng, tính bằng ml;

F: là hệ số pha loãng mẫu khi đo (nếu không pha loãng,  $F = 1$ );

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

### 8.4 Biểu thị kết quả

Kết quả được biểu thị bằng đơn vị  $\mu\text{g} / \text{kg}$  (ppb), hai số sau dấu phẩy.

## 9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- Thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu có;
- Phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- Các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả thử nghiệm;
- Độ lặp lại của phương pháp;
- Kết quả thử nghiệm thu được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] AFSSA-FOUGERES: Chloramphenicol identification by liquid chromatography tandem mass-spectrometry, 35133 France.
  - [2] A confirmatory method for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in honey, Waters Applications Note.
  - [3] Decision 2002/657/ EC of August 2002.
-